Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit des Elektrolytgehaltes und der Bindungskinetik herzwirksamer Glykoside an isolierten Vorhöfen.

von
Mischa von Bergh
und
Joachim Zagrodnick
1982

Diss. Düsseldorf

UCSD
LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0036

Aus dem Institut für Pharmakologie der
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Greeff

Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit des Elektrolytgehaltes und der Bindungskinetik herzwirksamer Glykoside an isolierten Vorhöfen

D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Mischa von Bergh und Joachim Zagrodnick

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Noack

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schnurr

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Methode
3. Ergebnisse
3.1. Einfluß der Schlagfrequenz auf die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen von Na^+, K^+ und Ca^{2+} und auf die Größe des Extrazellulärraumes
3.1.1. Untersuchung in Krebs-Henseleit-Lösung
3.1.2. Untersuchung in Tyrodelösung
3.2. Einfluß der Frequenz auf die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen in Gegenwart von 0,3 µMol/l Ouabain
3.3. Bestimmung der Extrazellulärraumveränderung unter der Einwirkung von Digitoxin
3.4. Bestimmung der Austauschkinetik von Ouabain mit dem Extrazellulärraum des Vorhofgewebes
3.5. Zeitliche Abhängigkeit der spezifischen und unspezifischen Bindung von Ouabain und Digoxin unter Berücksichtigung ihrer Äquilibrierungsgeschwindigkeit mit dem Extrazellulärraum
3.5.1. Bestimmung der Bindung mit einer 0,3 µmolaren Ouabainlösung
3.5.2. Bestimmung der Bindung mit einer 0,2 µmolaren Ouabainlösung
3.5.3. Bestimmung der Bindung mit einer 2,5 nmolaren Ouabainlösung
3.5.4. Bestimmung der Bindung mit einer 2,5 nmolaren Ouabainlösung bei halbem Calciumgehalt der Inkubationslösung
3.5.5. Bestimmung der Bindung mit einer 0,6 µmolaren Digoxinlösung
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Dank an den Referenten
7. Literaturverzeichnis
8. Lebensläufe

1. Einleitung

Trotz intensivster experimenteller Forschungstätigkeit ist der Mechanismus der durch die herzwirksamen Glykoside am Herzen bewirkten positiven inotropen Wirkung immer noch weitgehend unbekannt. Es ist wahrscheinlich, daß die Na^+/K^+-aktivierbare Membran-ATPase auf direkte oder indirekte Weise an der Wirkungsvermittlung beteiligt ist, da sich herzwirksame Glykoside an sie mit hoher Affinität binden und sie in Konzentrationen hemmen, die an isolierten Herzpräparaten zur Steigerung der Herzkraft führen. Die Funktion dieser ATPase ist dabei eng mit der Natrium-Kalium-Pumpe des Sarkolemms verknüpft, die die physiologische Aufgabe hat, über den aktiven Auswärtstransport von Natrium einen hohen Kaliumgradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufzubauen. Änderungen in der Pumpaktivität, z. B. infolge Beeinflussung der ATPase-Aktivität, müßten sich daher in einer Verschiebung der intrazellulären Natrium/Kaliumkonzentration widerspiegeln, wenn es in der diastolischen Phase der Herzaktion nicht mehr zu einer restitutio ad integrum kommt. Andererseits gibt es Hinweise dafür, daß eine Erhöhung des intrazellulären Natriumspiegels mit einer Steigerung der Kontraktionskraft einhergeht (Glitsch et al., 1970). Offensichtlich bestehen also enge Beziehungen zwischen der Aktivität der Na^+/K^+-aktivierbaren ATPase, der Natriumpumpe, dem myokardialen Natriumgehalt und der Höhe der Inotropie.
In vorausgegangenen Untersuchungen an isolierten Vorhofpräparaten fanden Felgenträger und Zettner (1979), daß positiv inotrop wirksame Konzentrationen herzwirksamer Glykoside zu einer transitorischen Erhöhung des Kalium- bei gleichzeitiger Senkung des Natriumgehaltes führen, Änderungen, die über eine Stimulation der Natriumpumpe interpretiert werden können, und die bei der Anflutung der Glykoside in das Vorhofgewebe nur solange auftreten, wie subtherapeutische Konzentrationsbereiche

durchlaufen werden. Es fanden sich mit anderen Worten keine Elektrolytveränderungen mehr, sobald die Kontraktionskrafterhöhung ein Steady-state erreicht hatte. Auch durch eine Änderung der Schlagfrequenz muß es zu einer vergleichbaren Stimulation oder Hemmung von ATPase-Aktivität und Natriumpumpe kommen, wenn die physiologischen Erfordernisse für ein extra-/intrazelluläres Elektrolytgleichgewicht erfüllt werden sollen. Es erschien uns deshalb reizvoll, die Glykosideffekte in Abhängigkeit von der Schlagfrequenz zu untersuchen, um nähere Informationen über die oben beschriebenen zellulären Elektrolytveränderungen zu erhalten. Dabei bestimmten wir zusätzlich die Bindungsaffinität und -kinetik der herzwirksamen Glykoside, um auch für kurze Inkubationszeiten das Ausmaß der Elektrolytverschiebungen mit dem Ausmaß der jeweiligen Rezeptorbesetzung korrelieren zu können.

2. Methode

In den Versuchen wurden linke Vorhöfe von insgesamt 493 männlichen Meerschweinchen verwendet, die ein Durchschnittsgewicht von 525 g ± 8 g hatten. Das durchschnittliche Vorhofgewicht betrug 57,0 ± 0,9 mg.
Da die Vorhöfe nur aus wenigen Zellschichten aufgebaut sind und eine große Oberfläche besitzen, kann eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes erzielt werden, so daß im Kontrollversuch die Kontraktilität und die intrazellulären Elektrolytgehalte über Stunden konstant bleiben. Da der linke Herzvorhof keinen eigenen physiologischen Schrittmacher besitzt, ist er ein besonders geeignetes Modell, um die Frequenzabhängigkeit von Pharmaka durch künstliche elektrische Reizung zu untersuchen. Dabei können die Ergebnisse zusätzlich mit denjenigen am ruhenden Muskel verglichen werden. Für die schonende Präparation des linken Vorhofes ist es von Vorteil, daß er nur durch eine kleine ringförmige Gewebsbrücke mit dem Herzen verbunden ist, so daß bei der Abtrennung nur wenige Zellen verletzt werden.
Den durch Genickschlag getöteten Tieren wurde zum Ausbluten die Arteria carotis eröffnet, das schlagende Herz schnell entnommen und der linke Vorhof vorsichtig abpräpariert. An den am weitesten voneinander entfernten Enden wurden zwei Fäden angeknotet, von denen der eine Faden so auf einer Platinelektrode fixiert wurde, daß das Gewebe direkten Kontakt zu den Elektroden erhielt. Das andere Ende wurde zur Registrierung der Kontraktionskraft mit einem Stathamelement (UC-2B) verbunden, das über eine Wheatstonesche Brücke mit einem Hellige 4-Kanalschreiber verbunden wurde. Die Vorspannung betrug jeweils 9.81 mN. Es wurde mit 2-facher Schwellenstromstärke, Rechteckimpulsen von 2 msec Dauer und einer Frequenz von 30/50/60/90/120/240 oder 300 Schlägen pro Minute gereizt. Als Inkubationsmedium wurden die Lösungen nach Tyrode und Krebs-Henseleit verwendet. Die Begasung der Tyrode erfolgte mit ei-

nem Gemisch aus Carbogen und Sauerstoff, deren Anteile so bemessen waren, daß sich ein pH von 7,4 einstellte. Die Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung erfolgte hingegen mit reinem Sauerstoff.
Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Vorhöfe den Bädern entnommen, von den Elektroden abgetrennt, auf Filterpapier oberflächlich getrocknet und in einem 1,5 ml fassenden Eppendorfgefäß, das vorher tariert worden war, gewogen.
Aus der Badflüssigkeit wurden Proben von jeweils 0,1 ml zur Bestimmung der radioaktiv markierten Substanzen (z.B. $[^3H]$ - Inulin und ^{45}Calcium) entnommen. Zur Freisetzung der intrazellulären Elektrolyte und gleichzeitigen Hydrolyse des Inulins wurde den Vorhöfen 1 ml 0,5 n $HClO_4$ zugesetzt. Den Badproben wurde zur enzymatischen Inulinbestimmung 10 ml 0,5 n $HClO_4$ bzw. für die Bestimmung der radioaktiv markierten Substanzen 0,6 ml H_2O hinzugefügt. Die Vorhofproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang inkubiert.
Dann wurden folgende Parameter gemessen:

1. Der Inulinraum der Vorhöfe als Maß für den jeweiligen Extrazellulärraum und als Berechnungsgrundlage für das individuelle Zellgewicht,
2. der zelluläre Natrium- und Kaliumgehalt,
3. der zelluläre Calciumgehalt,
4. die relative spezifische ^{45}Calcium-Aktivität (RSA-$^{45}Ca^{2+}$),
5. das an das Vorhofgewebe spezifisch und unspezifisch gebundene $[^3H]$-Ouabain und $[^3H]$-Digoxin unter Berücksichtigung der im Extrazellulärraum befindlichen Anteile und die unter der Einwirkung von Digitoxin zu beobachtende Änderung des Extrazellulärraumes.

Zu 1. Die Bestimmung des Inulinraumes erfolgte enzymatisch nach Neutralisation von 0,2 ml des sauren Vorhofextraktes mit 0,5 ml 0,2 n NaOH mit der Hexokinasemethode (Noack und

Heinen, 1975), oder bei Verwendung von radioaktiv markiertem [^{14}C]-Inulin szintigrafisch nach Neutralisation von 0,2 ml Vorhofextrakt mit 0,5 ml 0,2 n NaOH und Zugabe von 7 ml eines Szintillators (Unisolve) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb Modell 3003, Packard).

Zu 2. Die Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehaltes erfolgte flammenphotometrisch nach Verdünnung von 0,1 ml des Vorhofextraktes mit 1 ml H_2O.

Zu 3. Die Bestimmung des zellulären Calciumgehaltes wurde in Anlehnung an die Methode von Geyer und Bowie (1961) mit einem Atomabsorptionsspektrofotometer (Modell 1236, Firma Beckmann) durchgeführt. Dazu wurden 0,25 ml des Vorhofextraktes zur Freisetzung des Calciums mit 1 ml einer 0,025 %igen $LaCl_3$-Lösung verdünnt und bei einer Wellenlänge von 422,7 nm gemessen.

Zu 4. Die Bestimmung der ^{45}Ca-Aktivität erfolgte aus 0,2 ml Vorhofextrakt nach Neutralisation mit 0,5 ml 0,2 n NaOH und Zugabe von 7 ml Szintillator (Unisolve) im Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb Modell 3003, Packard).

Zu 5. Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der [^{3}H]-Ouabain-Aufnahme in den Extrazellulärraum wurden linke Vorhöfe 45 Minuten lang in einer Inulintyrode bei einer Reizfrequenz von 90 Schlägen/min vorinkubiert. Anschließend wurde der Badflüssigkeit zur Absättigung der spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen ein 10 µmolare Digitoxinlösung hinzugefügt und der Austausch von [^{3}H]-Ouabain (5 nMol/l; 1 µCi/Bad) mit dem Extrazellulärraum nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30 und 45 Minuten Einwirkung gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen Bindung von Ouabain und Digoxin an das Vorhofgewebe wurde Tyrode als Inkubationslösung verwendet.

In einer Versuchsreihe wurde deren Calciumgehalt halbiert. Die Vorinkubation mit Inulin betrug stets 45 Minuten. Dann erfolgte die Zugabe von [^{3}H]-Ouabain (2,5 nMol/l; 0,15, 0,2 und 0,3 µMol/l) bzw. von Digoxin (0,6 µMol/l).

Zur Bestimmung der unspezifischen Glykosidbindung wurde dem [^{3}H]-Ouabain (5 nMol/l, 1 µCi/Bad) und dem [^{3}H]-Digoxin (0,1 nMol/l, 1 µCi/Bad) eine 2000- bzw. 100 000-fach höher konzentrierte Digitoxinlösung (10 µMol/l) hinzugegeben. Die Vorhöfe wurden dann jeweils 120 bzw. 180 Minuten bei einer Schlagfrequenz von 0, 30, 60, 90 und 240 Schlägen/min. inkubiert.

Dabei gingen wir davon aus, daß das Digitoxin jeweils das radioaktiv markierte Glykosid vom spezifischen Rezeptor verdrängt, so daß die Restradioaktivität des Gewebes ausschließlich der unspezifischen Bindung und Speicherung im Vorhofgewebe zuzuschreiben ist.

Die spezifische Ouabain- bzw. Digoxinbindung ermittelten wir anschließend durch Subtraktion der unspezifischen von der gemessenen Gesamtbindung.

Verwandte Lösungen und Substanzen:

1. Die als Inkubationslösung verwendete Inulintyrode enthielt 2,68 mMol/l Kalium, 146,3 mMol/l Natrium, 1,05 mMol/l Magnesium, 1,82 mMol/l Calcium, 11,1 g/l Glucose, 10 g/l Inulin bzw. 1 µCi [^{14}C]-Inulin/Bad. In einer Versuchsreihe wurde der Calciumgehalt auf 0,91 mMol/l reduziert.

2. Die als Inkubationsflüssigkeit verwendete Inulin-Krebs-Henseleit-Lösung enthielt 5,92 mMol/l Kalium, 143,5 mMol/l Natrium, 1,19 mMol/l Magnesium, 2,56 mMol/l Calcium, 11,1 g/l Glucose und 10 g/l Inulin.

3. Für die Inulinbestimmung: Biochemica Testkombination: Hexokinasemethode (Boehringer, Mannheim) und Phosphoglucoseisomerase (EC 5.3.1.9.; 1 mg/l).

4. Ouabain, Digoxin, Digitoxin (Boehringer, Mannheim).

5. [^{3}H(G)]-Ouabain mit einer spezifischen Aktivität von 19,3 Ci/mMol (New England Nuclear Corp., Boston, USA).

6. [^{3}H(G)]-Digoxin, spezifische Aktivität: 10 Ci/mMol (New England Nuclear Corp., Boston, USA).

7. [Carboxyl-^{14}C]-Carboxy-Inulin, spezifische Aktivität: 2,04 mCi/g (New England Nuclear Corp., Boston, USA).

8. $^{45}CaCl_2$, spezifische Aktivität: 721 mCi/mMol Ca^{++} für die Bestimmung des zellulär ausgetauschten Calciums (New England Nuclear Corp., Boston, USA).

9. Als Szintillationsflüssigkeit diente Unisolve I - Lösung (Koch-Light Laboratories Ltd., London, England).

Statistische Auswertung

Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student'schen t-Testes.
Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte $\pm$ der Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß der Schlagfrequenz auf die intrazellären Elektrolytkonzentrationen von Na^+, K^+ und Ca^{2+} und auf die Größe des Extrazellulärraumes

3.1.1. Untersuchung in Krebs-Henseleit-Lösung

Die stufenweise Steigerung der Schlagfrequenz von 30 auf 60, 120 und 240 Schläge/min führte innerhalb von 45 Minuten zu einer ausgeprägten Änderung des intrazellulären Elektrolytgehaltes. Wie Abb. 1 zeigt, ergab sich dabei stets eine Erhöhung der Natrium- und Calciumkonzentration und eine Erniedrigung der Kaliumkonzentration. Der Natriumgehalt der Vorhöfe nahm in dem untersuchten Frequenzbereich zwischen 30 und 240 Schlägen/min von 29,4 auf 36,9 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,0005$) zu, während der Kaliumgehalt gleichzeitig von 119,4 auf 101,6 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,025$) abnahm. Die Calciumkonzentration stieg durch die Erhöhung der Schlagfrequenz von 1,83 auf 2,38 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,0125$) an. Auch die Größe des Extrazellulärraumes der Vorhöfe änderte sich. Dieser nahm hoch signifikant um 13 % von 30,5 % auf 26,5 % ($p<0,0005$) ab. Gleichzeitig nahm die Kontraktionskraft, wie Abb. 3 zeigt, um 24,9 % von 24,4 mN bei 30 Schlägen/min auf 18,3 mN bei 240 Schlägen/min ($p<0,005$) ab.

Um eine Information über die Schnelligkeit zu erhalten, mit der die gefundenen Elektrolytveränderungen vor sich gehen, bestimmten wir in einer weiteren Versuchsreihe den intrazellulären Elektrolytgehalt und die Kontraktionskraft eine bzw. 10 Minuten nach Steigerung der Schlagfrequenz von 50 auf 300 Schläge/min (Abb. 4). Dabei zeigte sich, daß es bereits eine Minute nach der Frequenzerhöhung zu einem zellulären Kaliumverlust von 4,1 % (n. s.) und einer Natriumzunahme um 4,9 % (n. s.) kam. Die Calciumkonzentration fiel um 33,9 % ($p<0,025$) ab, wobei gleichzei-

tig die $^{45}Ca^{2+}$-RSA als Ausdruck der freien Calciumkonzentration um 5 % (n. s.) zunahm. Gleichzeitig stieg entsprechend dem Bowditch-Treppenphänomen die Kontraktionskraft um 26,7 % ($p<0,0005$) an. Bereits 10 Minuten nach der Frequenzerhöhung war die Kontraktionskraft gegenüber dem Ausgangswert wieder um 18,2 % ($p<0,01$) abgesunken. Die Kaliumkonzentration nahm dagegen weiter um insgesamt 18,3 % ($p<0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert ab. Die Natriumkonzentration erhöhte sich nur noch leicht um insgesamt 7,9 % (n. s.). Die Ergebnisse zur $^{45}Ca^{2+}$-Austauschbarkeit können wegen der Kürze der Inkubationszeit nur als semiquantitativ angesehen werden.

3.1.2. Untersuchung in Tyrodelösung

Die hierbei festgestellten Veränderungen im zellulären Elektrolytgehalt entsprachen grundsätzlich den in Krebs-Henseleit-Lösung beschriebenen Verschiebungen. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Effekte unabhängig vom verwendeten Inkubationsmedium sind. Im einzelnen kam es innerhalb von 90 Minuten zu einer Zunahme von Natrium von 31,3 auf 36,1 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,05$), zu einer Abnahme von Kalium von 116,6 auf 108,0 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,05$) und einer Zunahme von Calcium von 1,74 auf 2,26 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,025$) (Vergl. Abb. 1). Auch die Extrazellulärraumveränderung war mit der vorausgegangenen Untersuchung fast identisch. Es kam zu einer Abnahme um 13 % von 37,6 % auf 32,8 % ($p<0,05$).

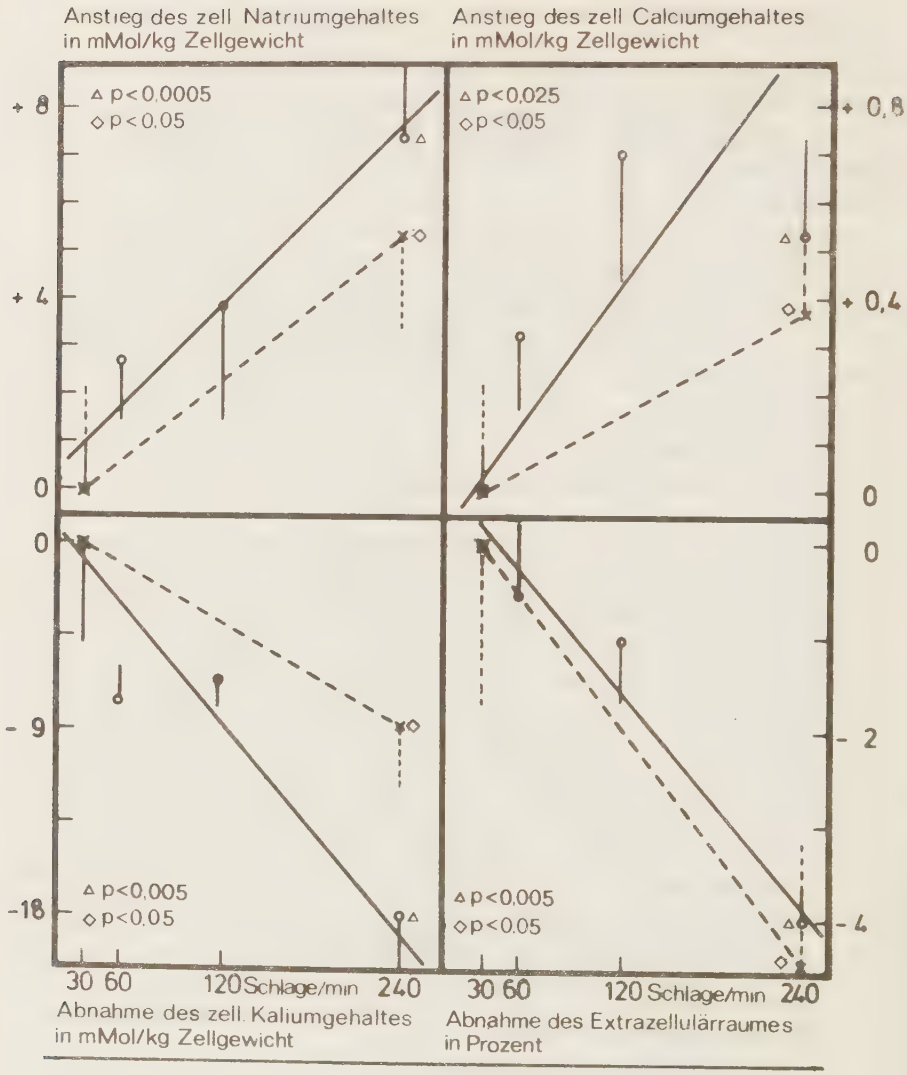

Abb. 1 Einfluß der Frequenz auf die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen und den Extrazellulärraum bei Verwendung von Krebs-Henseleit- ——— (n = 66) bzw. Tyrodelösung - - - (n = 16) als Inkubationsmedium.

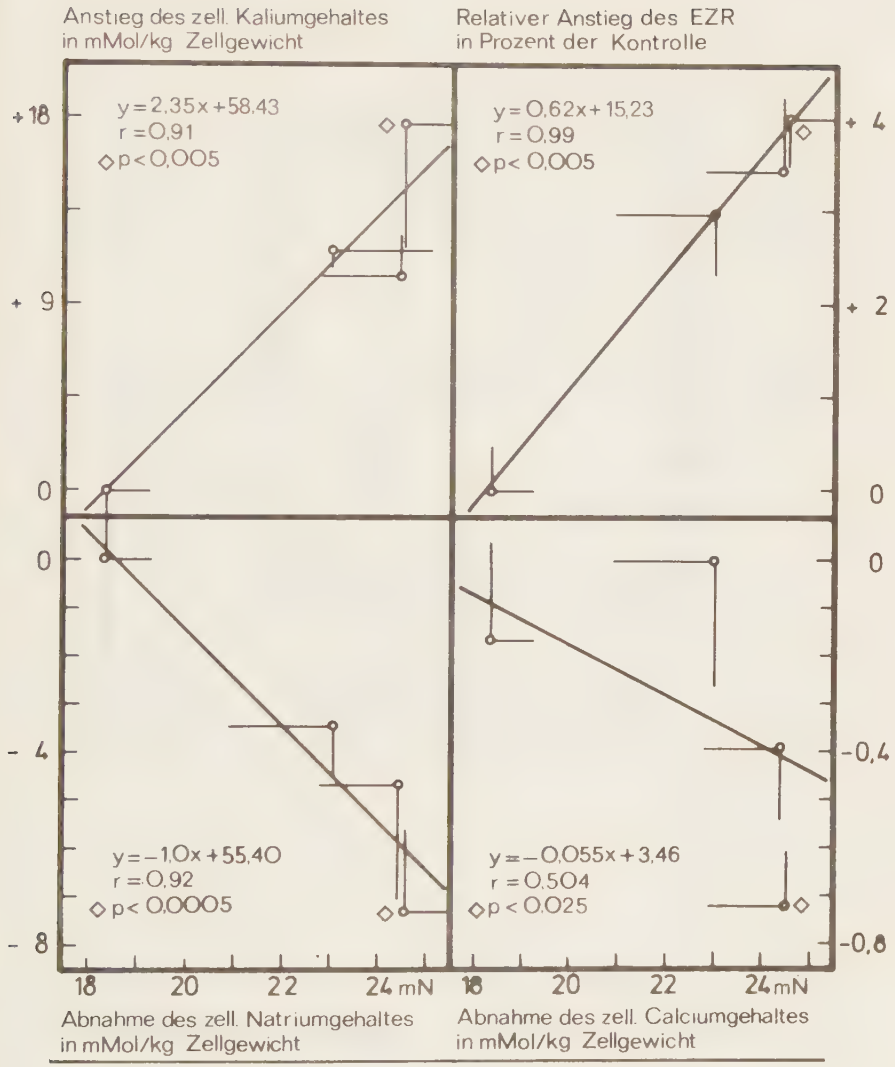

Abb. 2 Beziehung zwischen der Größe der Kontraktionskraft und der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen bzw. der Größe des Extrazellulärraumes isolierter linker Vorhofpräparate (n = 66).

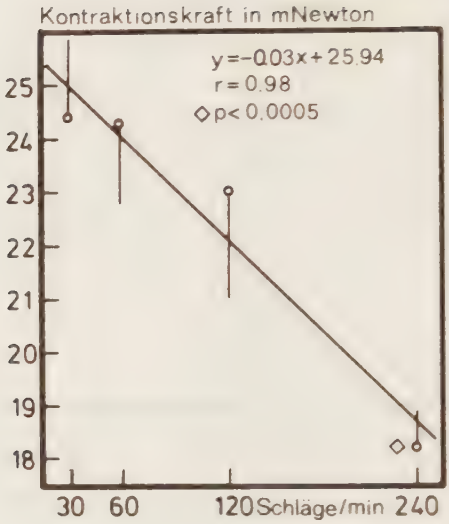

Abb. 3 Einfluß der Schlagfrequenz auf die Kontraktionskraft isolierter linker Vorhöfe (n = 66).

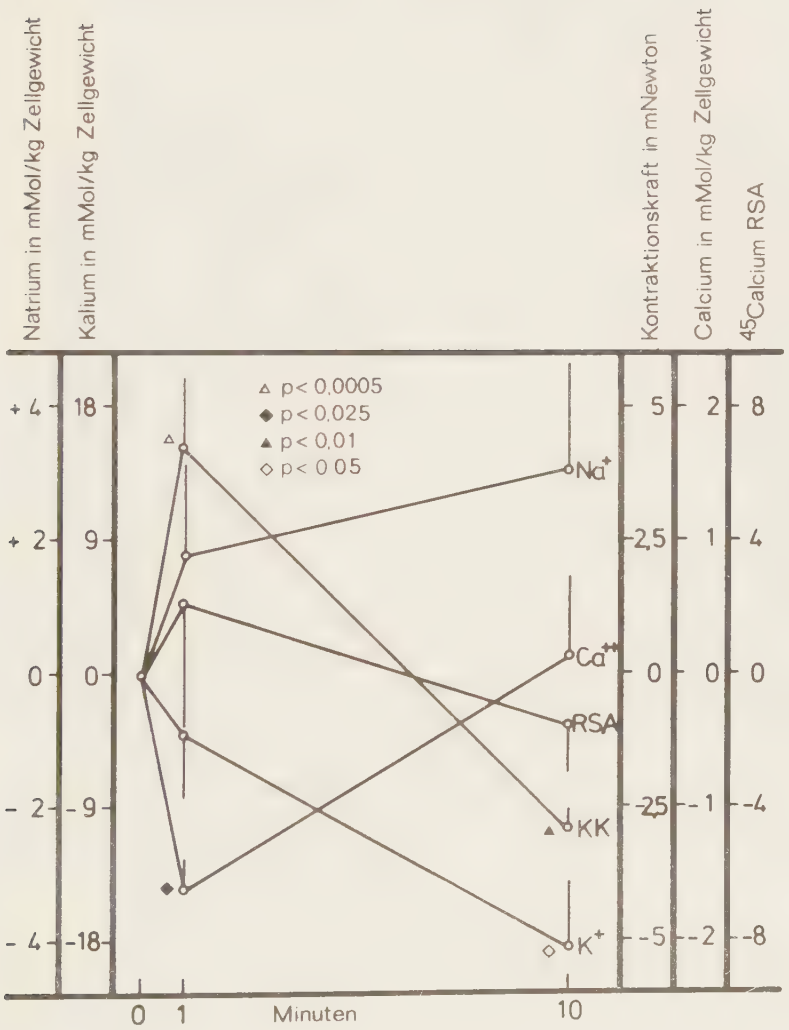

Abb. 4 Zunahme bzw. Abnahme der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen, der ^{45}Calcium RSA und der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Zeit nach einer Frequenzsteigerung von 50 auf 300 Schläge/min (n = 24).

3.2. Einfluß der Frequenz auf die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen in Gegenwart von 0,3 µMol/l Ouabain

In früheren Untersuchungen von Noack et al. (1978 und 1979) war festgestellt worden, daß es in Gegenwart positiv inotroper Konzentrationen von Ouabain bzw. Digitoxigenin zu einer transitorischen Erhöhung des zellulären Kalium- und zur Senkung des Natriumgehaltes kommt (90 Schläge/min.). Da die Ausbildung der positiv inotropen Wirkung in Gegenwart herzwirksamer Glykoside frequenzabhängig ist, interessierte uns die Frage, ob dies auch für die transitorischen Elektrolytveränderungen zutreffen könnte. Wir untersuchten dazu den Einfluß von o,3 µMol/l Ouabain bei einer Frequenz von 30 Schlägen/min. In Übereinstimmung mit den früheren Ergebnissen stieg der intrazelluläre Kaliumgehalt, wie Abb. 5 zeigt, 5 Minuten nach Zugabe des Ouabains um 8 % ($p<0,05$). Gleichzeitig sank der zelluläre Natriumgehalt signifikant um 21 % ($p<0,05$) ab. Nach 30 Minuten waren für Kalium und Natrium die Ausgangswerte wieder erreicht. Die Kontaktionskraft war zu diesem Zeitpunkt um 29,8 % angestiegen.

Bei höheren Frequenzen ließen sich allerdings keine signifikanten Veränderungen des intrazellulären Kalium- und Natriumgehaltes mehr feststellen.

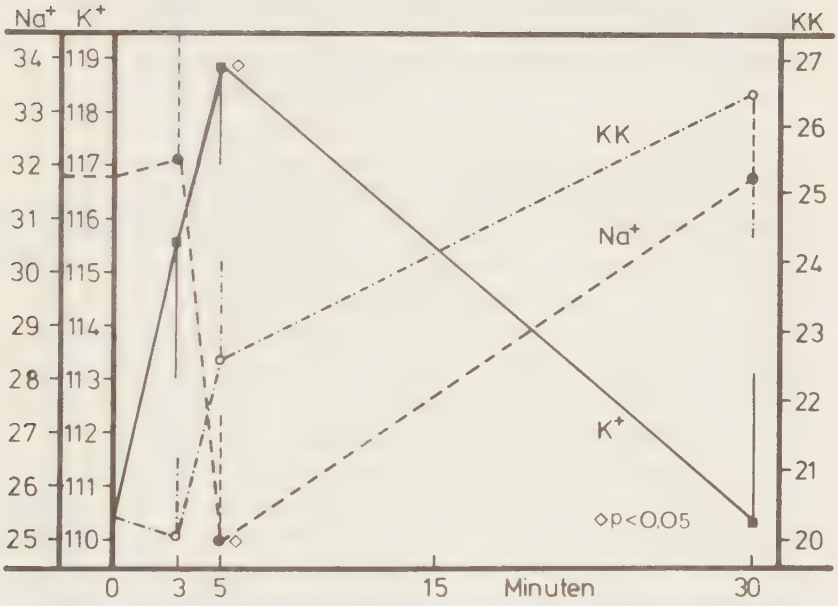

Abb. 5 Elektrolytkonzentrationen und Kontraktionskraft (KK) in Gegenwart von 0,3 µMol/l Ouabain bei verschiedenen Inkubationszeiten:
---- Natrium in mMol/kg Zellgewicht,
——— Kalium in mMol/kg Zellgewicht,
-·-·- Kontraktionskraft in mNewton,
Frequenz: 30 Schläge/min, (n = 32).

3.3. Bestimmung der Extrazellulärraumveränderung unter Einwirkung von Digitoxin

Um eine Beziehung zwischen dem zeitlichen Verlauf der zellulären Elektrolytveränderungen und dem Ausmaß der spezifischen Bindung der herzwirksamen Glykoside an das Vorhofgewebe herstellen zu können, ist die Kenntnis der Äquilibrierungskinetik von Ouabain zwischen dem Inkubationsmedium und dem Extrazellulärraum der Vorhöfe unbedingte Voraussetzung. Orientierende Versuche hatten nämlich ergeben, daß es Minuten dauert, bis sich Ouabain nach der Zugabe homogen im Extrazellulärraum verteilt hat. Um die Kinetik dieses Austauschprozesses messen zu können, muß verhindert werden, daß sich das Glykosid an spezifische Bindungsstellen des Gewebes setzt und dort anreichert. Dies kann dadurch erreicht werden, daß dem Ansatz gleichzeitig eine hohe Dosis (10 µMol/l) von nicht radioaktiv markiertem Digitoxin zugefügt wird, welches das markierte Ouabain von den genannten Bindungsstellen kompetitiv und praktisch vollständig verdrängt. Um die durch toxische Glykosidkonzentrationen hervorgerufenen Veränderungen der Extrazellulärraumgröße mitberücksichtigen zu können, bestimmten wir in Vorversuchen den Einfluß von 10 µMol/l Digitoxin auf die Größe des Extrazellulärraumes isolierter, mit 90 Schlägen/min gereizter Vorhöfe. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Bei einer mittleren Ausgangsgröße des Extrazellulärraumes von 35,8 % des Gesamtfeuchtgewichtes und einem Calciumgehalt von anfänglich 0,93 mMol/kg Zellgewicht sank der Extrazellulärraum in Gegenwart von 10 µMol/l Digitoxin bereits nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf 20,1 % ($p < 0{,}0005$) und einen mittleren Calciumgehalt von 2,58 mMol/kg Zellgewicht ($p < 0{,}001$) ab. Nach 30 Minuten war der Extrazellulärraum sogar

bis auf 17,5 % ($p<0,0005$) verkleinert und der zelluläre Calciumgehalt als Ausdruck einer intrazellulären Calcifizierung bis auf 2,74 mMol/kg Zellgewicht ($p<0,0005$) angestiegen, was einer Erhöhung um 195 % entspricht. Die Ergebnisse zeigen, daß die quantitative Bestimmung der Austauschkinetik von Ouabain mit dem Extrazellulärraum für die individuelle Erfassung der Extrazellulärraumgröße unabdingbare Voraussetzung ist.

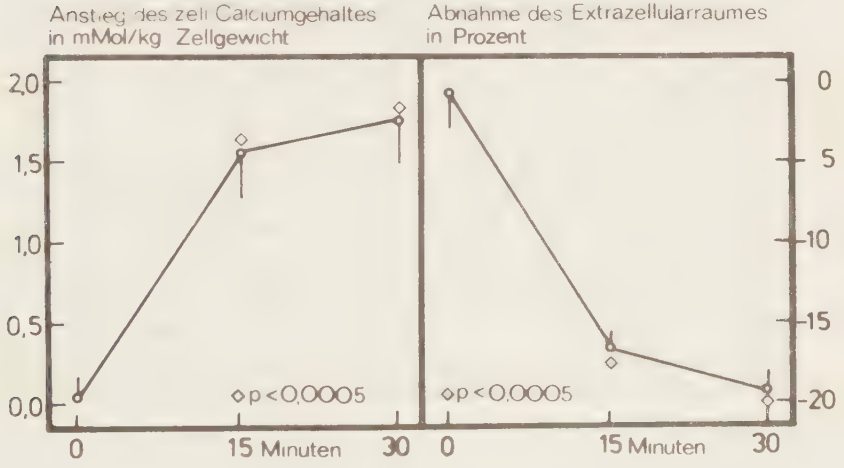

Abb. 6 Einfluß einer 10 µMol/l Digitoxinlösung auf das Extrazellulärraumvolumen und den intrazellulären Calciumgehalt in Abhängigkeit von der Zeit (n = 18).

3.4. Bestimmung der Austauschkinetik von Ouabain mit dem Extrazellulärraum des Vorhofgewebes

Da die Äquilibrierung des Extrazellulärraumes mit den anorganischen und organischen Bestandteilen des Inkubationsmediums (z.B. von Ouabain) Zeit erfordert, ist für die quantitative Berechnung der geweblichen Glykosidbindung für kurze Inkubationszeiten (0 bis 30 Minuten) die genaue Kenntnis der zeitlichen Abhängigkeit des Glykosidaustausches mit dem Extrazellulärraum (EZR) Voraussetzung. Der mittlere EZR betrug 29,8 %. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren. So fanden Kleinzeller und Knotkova (1961) am Meerschweinchenvorhof 25 bis 26 %, Bauer (1961) 32 %, Little und Sleator (1969) 27,5 % und Noack et al. (1979) 27 bis 31 %. Unmittelbar nach der Zugabe von Ouabain war bereits mehr als ein Viertel des Extrazellulärraumes (28,3 %) aufgefüllt. Dieser Anteil repräsentiert offensichtlich jene Areale der Zelloberfläche, die der Inkubationslösung direkt zugänglich sind bzw. jene Flüssigkeitsmenge, die trotz Abtrocknung mit Filterpapier auf der Gewebsoberfläche haften bleibt. Die vollständige Auffüllung des EZR mit Ouabain war hingegen erst nach 45 Minuten abgeschlossen. Für den Austauschvorgang errechneten wir eine Halbwertzeit von 2,9 Minuten.

Die mathematische Anpassung der Ergebnisse gelang am besten unter Zugrundelegung einer e-Funktion. Dabei ergab sich folgender mathematischer Zusammenhang:

$$Y = 69{,}87 \times (1-e^{-0{,}109 \times t}) + 28{,}26,$$

wobei t die Austauschzeit in Minuten und
Y die prozentuale Auffüllung des EZR
repräsentiert (Abb. 7).

Diese Funktion wurde den Berechnungen bei den weiteren Bindungsstudien zugrundegelegt.

Der T/M Quotient (sogenannter Tissue-Medium-Quotient) als Ausdruck des an das Vorhofgewebe gebundenen Anteils von $[^3H]$-Ouabain im Verhältnis zu der frei in der Inkubationslösung vorhandenen $[^3H]$-Ouabainmenge betrug nach 45 Minuten, also nach sicher abgeschlossener Äquilibrierung, 0,8 (T/M Quotient = Ouabainkonzentration pro g Zellgewebe dividiert durch die Konzentration pro ml Inkubationslösung).

Über ähnliche Ergebnisse berichteten Kuschinsky et al. (1967). Sie fanden für Ouabain einen T/M Quotienten zwischen 0,5 und 0,7. Über einen etwas höheren T/M Quotienten von 2 berichten Bentfeld et al. (1977).

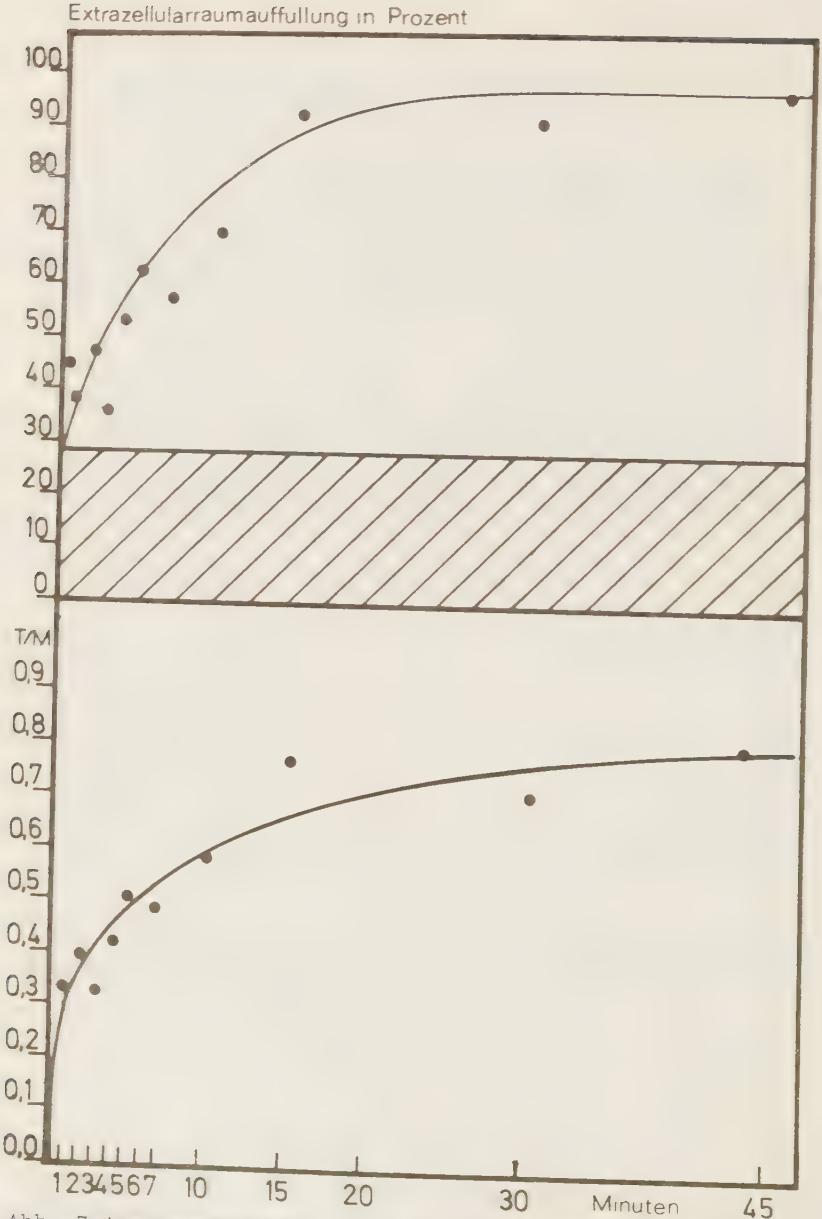

Abb. 7 Austauschkinetik von 5 nMol/l Ouabain (1 µCi $[^3H]$ / Bad) mit dem Extrazellulärraum von Vorhofgewebe. T/M = Gewebe-Medium-Quotient. Die abgebildeten Punkte repräsentieren Mittelwerte von jeweils 2 oder 3 Einzelversuchen (n = 26).

3.5. Zeitliche Abhängigkeit der spezifischen und unspezifischen Bindung von Ouabain und Digoxin unter Berücksichtigung ihrer Äquilibierungsgeschwindigkeit mit dem Extrazellulärraum

3.5.1. Bestimmung der Bindung mit einer 0,3 µmolaren Ouabainlösung

Zu den mit einer Frequenz von 0, 30, 120 oder 240 Schlägen/min arbeitenden Vorhöfen wurde eine 0,3 µmolare Ouabainlösung hinzugegeben, da diese sich in Vorversuchen als die am stärksten positiv inotrope Konzentration herausstellte, die auch bei einer Reizfrequenz von 240 Schlägen/min noch keine toxischen Reaktionen zeigte. Die Gesamtbindung (Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung) wurde nach 3, 5 und 30 Minuten bestimmt. Wie Abb. 8 (oberer Teil) zeigt, fanden wir bei ruhenden Vorhöfen nach 30-minütiger Inkubation eine Ouabainbindung von 66,5 nMol/kg Zellgewebe. Bei einer Frequenz von 30 Schlägen/min stieg die Bindung um 118 % auf 144,7 nMol Ouabain/kg Zellgewebe ($p<0,0005$), bei 120 Schlägen/min um 280 % auf 252,5 nMol Ouabain/kg Zellgewebe ($p<0,0005$) und nahm schließlich bei 240 Schlägen/min um 319 % auf 278,5 nMol Ouabain/kg Zellgewebe ($p<0,0005$) zu. Die Zahl der besetzten Bindungsstellen pro g Feuchtgewicht betrug bei ruhenden Vorhöfen $3,1 \times 10^{13}$ und stieg bei einer Frequenz von 30 Schlägen/min auf $5,9 \times 10^{13}$, bei 120 Schlägen/min auf $10,2 \times 10^{13}$ und bei 240 Schlägen/min auf $11,8 \times 10^{13}$ an.
Der T/M Quotient betrug nach 30 Minuten bei ruhenden Vorhöfen 0,4 und stieg frequenzabhängig zwischen 30 bis 240 Schlägen/min von 0,65 auf 1,06 an (Abb. 8). Diese Werte stimmen gut mit den von Kuschinsky et al. (1967) gefundenen überein. Auch Bentfeld (1977) beschreibt eine vergleichbare Frequenzabhängigkeit.

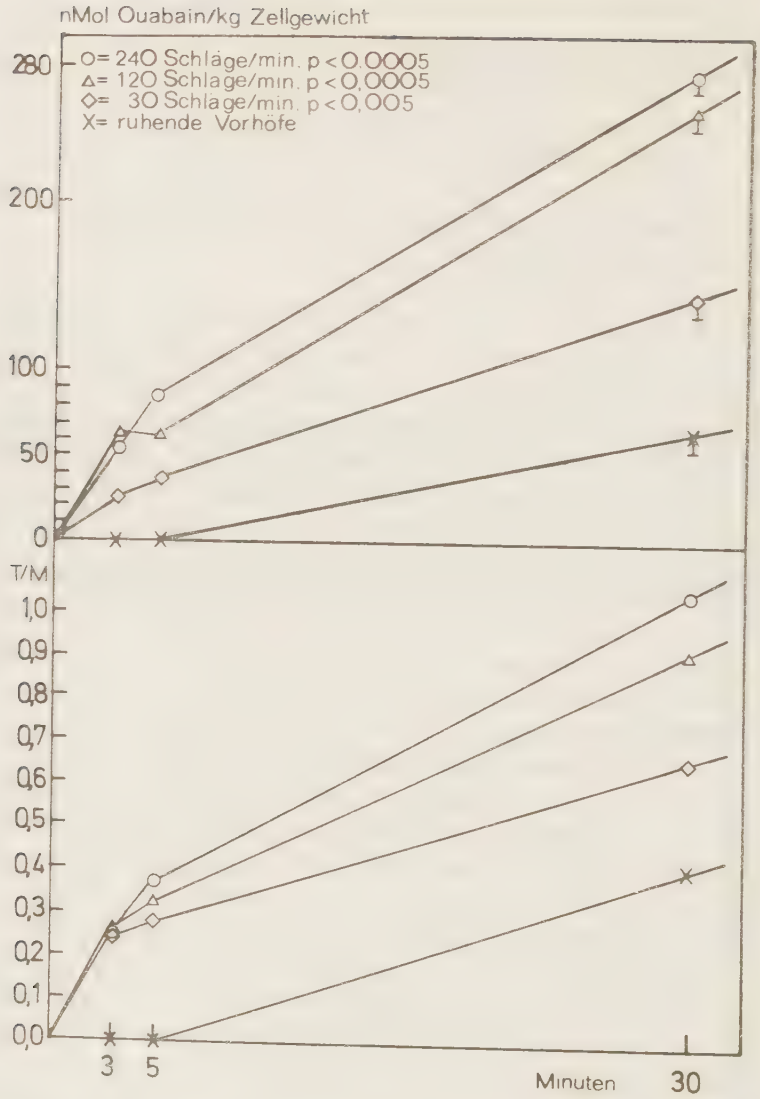

Abb. 8 Bindung von 0,3 µMol/l Ouabain an Vorhofgewebe in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Schlagfrequenzen.
Signifikanzangabe zum Zeitpunkt 30 Minuten erfolgte gegenüber ruhenden Vorhöfen.
Die abgebildeten Punkte repräsentieren Mittelwerte von jeweils 7 - 10 Einzelversuchen (n = 96).

3.5.2. Bestimmung der Bindung mit einer 0,2 µmolaren Ouabainlösung

In dieser Versuchsreihe wurden die Vorhofpräparate mit einer Schlagfrequenz von 90 Schlägen/min gereizt. Die Bestimmung der spezifischen und unspezifischen Ouabainbindung erfolgte über einen längeren Zeitraum, nämlich zwischen einer und 120 Minuten.
Wie aus Tab. 1 hervorgeht, erreichte die spezifische Ouabainbindung nach 90 Minuten mit 452,6 nMol/kg Zellgewebe einen Steady-state. Hierbei waren 18,2 x 10^{13} Bindungsstellen pro g Feuchtgewicht besetzt. Die Halbwertzeit für diese Sättigungskinetik betrug 21,7 Minuten. Die unspezifische Ouabainbindung betrug 0,046 nMol Ouabain/kg Zellgewicht/min. Dabei ergab sich für diese Bindung ein linearer zeitlicher Zusammenhang. Eine vergleichbare lineare Beziehung haben Kuschinsky (1964) und Godfraind (1972) in ähnlicher Weise beschrieben.

Zeit in Minuten	spezifische Ouabainbindung	unspezifische Ouabainbindung	gesamte Ouabainbindung
1	34,40	0,05	34,45
3	47,08	0,14	47,22
5	77,50	0,23	77,73
7	71,75	0,32	71,89
10	122,27	0,46	122,73
15	120,69	0,69	121,38
30	317,13	1,38	318,51
60	248,71	2,75	251,46
90	479,69	4,13	483,82
120	424,41	5,51	429,92

Tab. 1 Ouabainbindung in nMol/kg Zellgewicht bei einer Konzentration von 0,2 µMol/l. Jede Angabe entspricht einem Doppelwert.

3.5.3. Bestimmung der Bindung mit einer 2,5 nmolaren Ouabainlösung

Bei der Inkubation mit dieser Ouabainlösung wurden die spezifische sowie die unspezifische Ouabainbindung im Zeitraum zwischen 20 Sekunden und 90 Minuten untersucht. Hierbei stellten wir fest, daß dem Bindungsvorgang offensichtlich zwei Rezeptortypen zugrundeliegen. Wir beobachteten nämlich, wie in Abb. 9 dargestellt, eine schnelle Rezeptorbesetzung, die nach 15 Minuten abgeschlossen war und eine Halbwertzeit von 2,7 Minuten besitzt und eine langsame Rezeptorbesetzung, die nach 35 Minuten abgeschlossen war und eine Halbwertzeit von 14,8 Minuten hat. Hierbei betrug die spezifische Ouabainbindung 3,4 nMol/kg Zellgewicht. Es waren $0,16 \times 10^{13}$ Bindungsstellen pro g Feuchtgewicht besetzt. Die unspezifische Ouabainbindung betrug wegen der geringen Konzentration nur 3,2 pMol Ouabain/kg Zellgewicht/min.

3.5.4. Bestimmung der Bindung mit einer 2,5 nmolaren Ouabainlösung bei halbem Calciumgehalt der Inkubationslösung

In dieser Versuchsreihe (Abb. 10) wurde der Calciumgehalt der Inkubationslösung auf 0,91 mMol/l Calcium halbiert. Auch hierbei fand eine biphasische Rezeptorbesetzung statt. Eine schnelle mit einer Halbwertzeit von 5,2 Minuten und eine langsame mit einer Halbwertzeit von 37,5 Minuten. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten betrug die spezifische Ouabainbindung 12,6 nMol/kg Zellgewicht. Dabei waren $0,50 \times 10^{13}$ Bindungsstellen pro g Feuchtgewicht besetzt. Die unspezifische Ouabainbindung war mit 6,8 pMol Ouabain/kg Zellgewicht/min etwa doppelt so hoch wie bei normalem Calciumgehalt des Mediums.

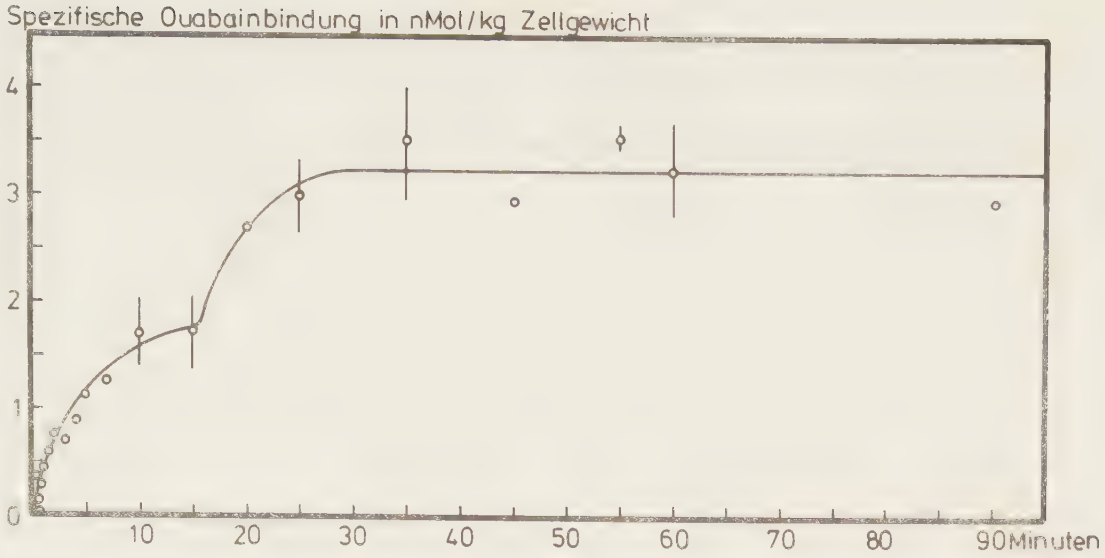

Abb. 9 Spezifische Bindung einer 2,5 nMol/l Ouabainlösung an Vorhofgewebe des Meerschweinchens bei einer Frequenz von 90 Schlägen/min. Calciumgehalt der Tyrodelösung 1,82 mMol/l, entsprechend einer freien Calcium-Konzentration von 0,71 mMol/l (die Messung erfolgte mit einer Calciumsensitiven Elektrode (Orion)).
Die abgebildeten Punkte repräsentieren Mittelwerte von jeweils 2 Einzelversuchen (n = 40).

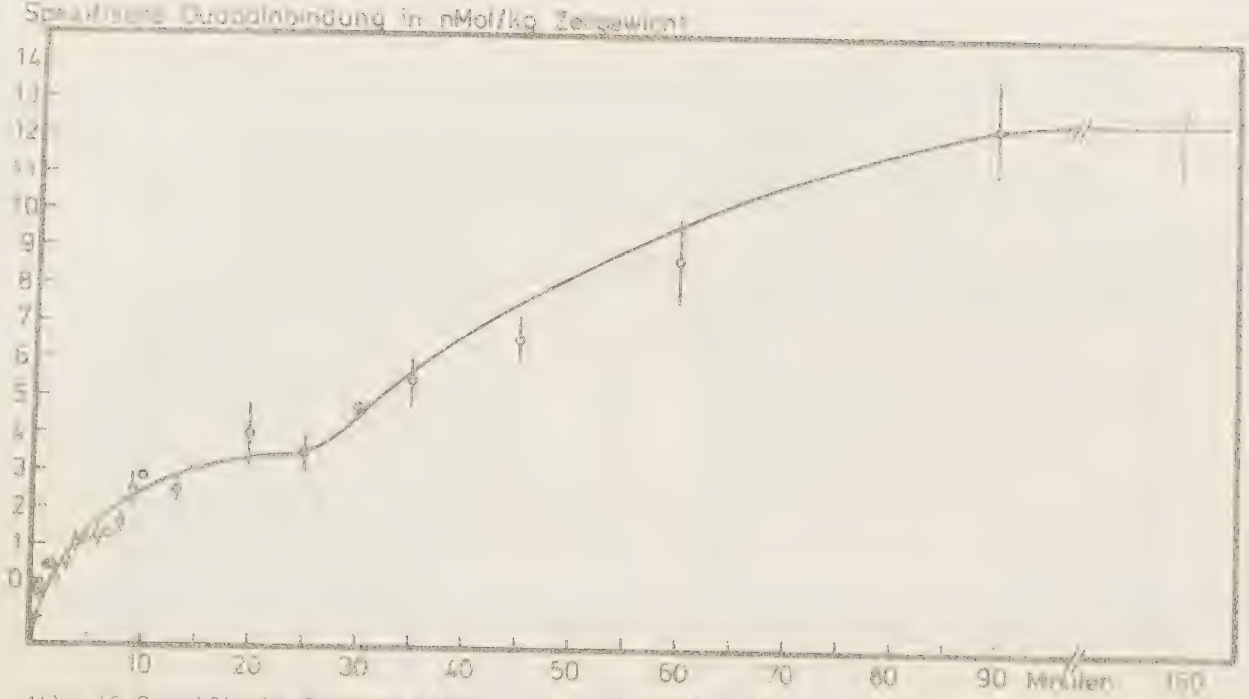

Abb. 10 Spezifische Bindung einer 2,5 nMol/l Ouabainlösung an verbliebenen Zellen des Meerschweinchens bei einer Frequenz von 90 Schlägen/min.
Calciumgehalt der Tyrodelösung 0,91 mMol/l, entsprechend einer freien Calcium-Konzentration von 0,46 mMol/l.
Die abgebildeten Punkte repräsentieren Mittelwerte von jeweils 2 - 3 Einzelversuchen (n = 55).

3.5.5. Bestimmung der Bindung mit einer 0,6 µmolaren Digoxinlösung

Um das Bindungsverhalten unterschiedlicher herzwirksamer Glykoside miteinander vergleichen zu können, bestimmten wir auch die Bindungskinetik für eine 0,6 µmolare Digoxinlösung, die die gleiche pharmakodynamische Wirkstärke besaß wie die 0,3 µmolare Ouabainkonzentration in den vorausgegangenen Experimenten. Die mit 30, 60 und 240 Schlägen/min gereizten Vorhöfe wurden mit der Digoxinlösung inkubiert und sowohl die gesamte als auch die unspezifische Digoxinbindung während 180 Minuten bestimmt. Wie Abb. 11 verdeutlicht, betrug die Gesamtbindung bei 30 Schlägen/min 809,7 nMol Digoxin/kg Zellgewicht ($n = 6$). Sie stieg bei 60 Schlägen/min auf 985,8 nMol/kg Zellgewicht an, was einer Steigerung von 21,7 % entspricht ($n = 4$, n. s.). Bei 240 Schlägen/min waren 1357 nMol Digoxin/kg Zellgewicht gebunden, was einer Steigerung von 67,6 % ($n = 10$, $p < 0,0005$) entspricht. Demgegenüber stellten wir keinen signifikanten Unterschied in der frequenzbezogenen unspezifischen Digoxinbindung fest. Sie betrug nach 180 Minuten bei einer Frequenz von 30 Schlägen/min 587,7 nMol/kg Zellgewicht und stieg bei 60 Schlägen/min um nur 15 % auf 667,9 nMol/kg Zellgewicht ($n = 2$, n. s.) und bei 240 Schlägen/min um 14 % auf 668,9 nMol/kg Zellgewicht ($n = 4$, n. s.) an (Abb. 12, ◆——◆). Daraus errechnet sich eine mittlere unspezifische Digoxinbindung von 3,6 nMol Digoxin/kg Zellgewicht/min.
Die spezifische Digoxinbindung (Abb. 12, ▲——▲) verlief parallel zu der Gesamtbindung. Sie betrug bei 30 Schlägen/min 222,0 nMol/kg Zellgewicht ($n = 6$) und stieg bei 60 Schlägen/min auf 307,9 nMol/kg Zellgewicht ($n = 4$, n. s.). Bei 240 Schlägen/min waren 687,9 nMol/kg Zellgewicht spezifisch gebunden, was einer Steigerung von 209 % ($n = 10$, $p < 0,005$) entspricht.
Bei 30 Schlägen/min waren $9,3 \times 10^{13}$, bei 60 Schlägen/min $13,0 \times 10^{13}$ und bei 240 Schlägen/min $30,3 \times 10^{13}$ Bindungsstellen pro g Feuchtgewicht besetzt.

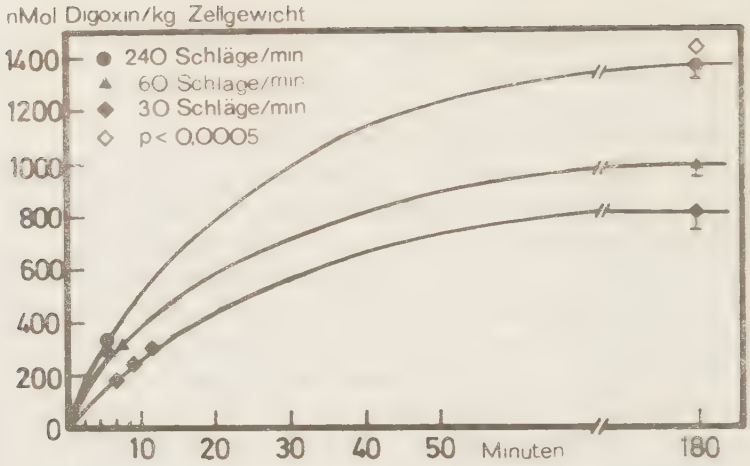

Abb. 11 Zeitabhängigkeit der Bindung von 0,6 µMol/l Digoxin bei verschiedenen Schlagfrequenzen. Die Signifikanzangabe zum Zeitpunkt 180 Minuten erfolgte gegenüber den mit 30 und mit 60 Schlägen/min gereizten Vorhöfen (n = 72).

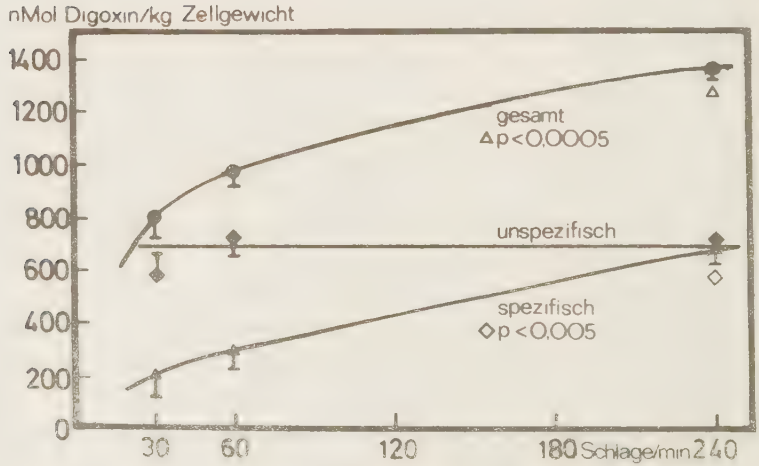

Abb. 12 Spezifische, unspezifische und Gesamtbindung von 0,6 µMol/l Digoxin in Abhängigkeit von der Schlagfrequenz.
Inkubationszeit 180 Minuten, (n = 28).

4. Diskussion

Für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Kontraktionsablaufes verfügt die Herzmuskelzelle im Sarkolemma über eine energieabhängige, gerichtete Ionenpumpe, welche die während der Systole eingeströmten Natriumionen im Austausch gegen extrazellulär lokalisierte Kaliumionen wieder hinausbefördert. Durch eine Steigerung der Reizfrequenz nimmt die beschriebene Pumpleistung im gleichen Maße zu, so daß in der Diastole immer weniger Zeit für die vollständige Wiederherstellung des Ionengleichgewichtes zur Verfügung steht. Bei Überschreitung der Pumpkapazität infolge Steigerung der Herzfrequenz muß es daher früher oder später zu einem intrazellulären Abfall der Kalium- und einem entsprechenden Anstieg der Natriumkonzentration kommen, bis sich ein neues frequenzanaloges Ionengleichgewicht eingestellt hat. Schon Langer (1970) gelang es, durch Flußmessungen indirekte Hinweise auf eine Verschiebung im Ionengleichgewicht zu erhalten, so daß das sogenannte Treppenphänomen nach Bowditch, d. h. die kurzfristige Zunahme der Kontraktionskraft bei Steigerung der Reizfrequenz, auf einer zunehmend größer werdenden intrazellulären Natriumkonzentration beruhen könnte.

In den vorliegenden Versuchen wird unseres Wissens nach zum ersten Mal experimentell belegt, daß die Steigerung der Reizfrequenz zu einer gerichteten Veränderung im intrazellulären Elektrolytgehalt führt, die sogar eine Verkleinerung des Extrazellulärraumes nach sich zieht. Diese Veränderungen sind überraschenderweise bereits im niedrigen Frequenzbereich signifikant, in einem Bereich also, in dem die Kapazität der Na^+/K^+-Pumpe mit Sicherheit noch nicht voll ausgeschöpft ist.
In unseren Versuchen verursachte ein Anstieg der Schlagfrequenz von 30 auf 240 Schläge/min innerhalb von 90

Minuten einen signifikanten intrazellulären Kaliumverlust von 15 %, eine Natriumzunahme von 25,5 %, sowie eine zelluläre Calciumzunahme von 30 %. Gleichzeitig stellte sich eine Minderung der Kontraktionskraft von 24,9 % und eine Verminderung des Extrazellulärraumes um 13 % ein. Dabei ist zu beachten, daß sich die Abnahme der Kontraktionskraft stets erst nach dem Durchlaufen einer nach dem Bowditch'schen Treppenphänomen zu postulierenden Erhöhung der Kontraktionskraft einstellte. Hier kommt es also offensichtlich zu einem zeitabhängigen gegenläufigen Prozeß. Beachtenswert erscheint uns dabei die starke Erhöhung des zellulären Calciumgehaltes, die eine Folge der intrazellulären Natriumerhöhung sein dürfte, da hierdurch der Austausch von intrazellulärem Natrium gegen extrazelluläres Calcium (Langer, 1970; Reuter, 1974) in Gang gesetzt wird. Dieser Befund erklärt sowohl die transitorische Erhöhung der Kontraktionskraft als auch die signifikante Verkleinerung des Extrazellulärraumes (Abb. 1 - 3), die auch von Noack (1979) in Gegenwart toxischer Glykosidkonzentrationen und hoher extrazellulärer Calciumkonzentrationen, sowie von Langer (1968) bzw. Legato et al. (1968) in elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben wurde. Sie setzt offensichtlich immer dann ein, wenn es durch Anreicherung von Calcium im sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Schwellung der tubulären Strukturen mit konsekutiver Einengung des Extrazellulärraumes kommt.
Bei Schlagfrequenzänderungen geringeren Ausmaßes, z. B. von 30 auf 60, bzw. von 60 auf 120 Schläge/min, kam es auch zu entsprechenden, signifikanten Änderungen im zellulären Natrium- und Calciumgehalt. Diese fielen aber geringer aus. Die gleichzeitige Abnahme des zellulären Kaliums war in diesem Fall nicht signifikant.
Versuche, in denen wir eine ausgeprägte Schlagfrequenzänderung von 50 auf 300 Schläge/min vornahmen, um eventuelle Elektrolyt- und Kontraktionskraftänderungen schon

nach einer und 10 Minuten erfassen zu können, erbrachten nach einer Minute eine signifikante Calciumabnahme um 33,9 % bei einem gleichzeitigen Anstieg der zellulären Calciumaustauschbarkeit (RSA) um 5 %, sowie eine nicht signifikante Kaliumab- und Natriumzunahme. Gleichzeitig stieg entsprechend dem Bowditch-Treppenphänomen (1871) die Kontraktionskraft signifikant um im Mittel 26,9 % an. Nach 10 Minuten hatte die Kontraktionskraft aber gegenüber der Kontrolle bereits wieder signifikant um 18,2 % abgenommen, wobei einige Vorhöfe sogar Zeichen einer beginnenden Kontraktur mit Anstieg der Ruhespannung aufwiesen. Dabei nahm das intrazelluläre Kalium gleichzeitig weiter um 18,3 % signifikant ab, während sich das intrazelluläre Natrium mit einem Anstieg um 7,9 % (n. s.) gegensinnig verhielt.

Über vergleichbare Ergebnisse berichten Hajdu (1953) und Langer (1965, 1966, 1967). Hajdu's Untersuchungen am Froschherzen zeigten, daß es beim Frequenzanstieg zu einem Kaliumverlust kommt, der in der Größenordnung zwischen 3 und 7 % liegt und von einem maximal ausgebildeten Bowditch-Treppenphänomen begleitet wird; Kaliumverluste, die über 7 % hinausgingen, waren stets mit einer Minderung der Kontraktionskraft verknüpft.
Auch Langer fand bei Untersuchungen am Hundeherzen in situ, daß Frequenzanstieg zu einer Kalium- und Calciumabnahme bei gleichzeitiger Natriumzunahme führt. Dabei kommt es entsprechend dem Bowditch-Treppenphänomen zu einer Kontraktionskraftsteigerung, die jedoch nur 2 - 3 Minuten andauerte. Eine Kontraktionskraftminderung trat bei Langer schon bei zellulären Kaliumverlusten von mehr als 2,7 % auf. Diese im Gegensatz zu Hajdu's und unseren Ergebnissen geringe Kaliumabgabe aus dem Herzen führt Langer auf Kaliumverluste zurück, die aufgrund der Versuchsanordnung zeitlich bereits vor dem Schlagfrequenzanstieg aufgetreten sein könnten. Mit dem Eintritt einer Kontraktionskraftabnahme beobachtete

Langer, wie wir in unseren Experimenten, einen intrazellulären Calcium- und Natriumanstieg.

Aufgrund des bisher Gesagten lassen sich für eine Steigerung der Herzfrequenz die Veränderungen der zellulären Elektrolyte und der Kontraktionskraft in folgende drei Phasen unterteilen:

1. Kurz nach einem Frequenzanstieg kommt es entsprechend dem Bowditch-Treppenphänomen zum Anstieg der Kontraktionskraft mit Abnahme des intrazellulären Kalium- und Calcium- sowie Zunahme des Natriumgehaltes. Dieser Zustand hält nur wenige Minuten an (Bowditch, 1871; Hajdu 1965; Langer 1965, 1966, 1967; Abb. 4).

2. Anschließend bildet sich unter Rückkehr der Kontraktionskraft auf die Höhe der Kontrollwerte bzw. einer noch weitergehenden Abnahme ein neues intrazelluläres Kalium/Natrium-Gleichgewicht aus.

3. Bei einem sehr hohen Frequenzanstieg (auf 240 bzw. 300 Schläge/min) kommt es zu einer starken Erniedrigung des K^+/Na^+-Gradienten mit einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft auf Werte weit unterhalb der Kontrolle. Das intrazelluläre Gesamtcalcium nimmt dabei signifikant zu.

Diese Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Na^+/K^+-aktivierbaren ATPase und der Höhe der Kontraktionskraft (Egli, 1975; Noack, 1978) bzw. der Schlagfrequenz (Langer, 1967) schließen. Nach Portius und Repke (1967), Schön et al. (1972) und Gervais et al. (1977) besteht ein Antagonismus zwischen Calcium- und Natriumionen um Bindungsstellen an der isolierten Na^+/K^+-ATPasepräparation. Auch Heinen und Noack (1972) zeigten am Vorhofpräparat des Meerschweinchens, daß der Calciumefflux während einer Blockierung

der ATPase durch toxische Herzglykosidkonzentrationen, vermutlich als Folge einer in Sarkolemmanähe stark erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration, völlig zum Erliegen kommt.

Wenn es während einer Herzfrequenzsteigerung zu einer intrazellulären Natriumzunahme kommt, so werden Natriumionen das Calcium aus ihrer Membranbindung oder sogar aus intrazellulären Speichern (Noack und Greeff, 1975) verdrängen. Das führt, wie aus Abb. 4 zu entnehmen ist, trotz einer Abnahme des Gesamtcalciumgehaltes zu einer Erhöhung der freien Calciumkonzentration und damit auch zu einer Steigerung der Kontraktionskraft (Langer, 1965; Heinen und Noack, 1972; Morgenstern und Noack, 1972; Egli, 1975). Dieser Kontraktionskraftanstieg hält so lange an, bis sich ein neues K^+/Na^+-Gleichgewicht einstellt, als dessen Folge die vorübergehend erhöhte "freie" Calciumkonzentration wieder abfällt. Dabei muß die Aktivität der membranären Na^+/K^+-ATPase gesteigert sein.
Ist der Frequenzanstieg und damit der Natriumeinstrom in die Zelle so groß, daß die Na^+/K^+-ATPase bzw. die Natriumpumpe trotz maximaler Pumpaktivität den intrazellulären K^+/Na^+-Gradienten nicht mehr aufrechterhalten kann, so wird der intrazelluläre Calciumgehalt weiter ansteigen. Übersteigt sie die intrazelluläre Aufnahmekapazität der Calciumspeicher, insbesondere des sarkotubulären Systems, so erfolgt eine vermehrte Aufnahme von Calcium in die Mitochondrienfraktion (Nayler, 1980) bei gleichzeitiger Ausbildung einer Kontraktur mit Minderung der Kontraktionskraft, so wie man es in Gegenwart toxischer Digitaliskonzentrationen typischerweise beobachtet.
Ist also bei einem Frequenzanstieg die Na^+/K^+-ATPase in der Lage, das in die Zelle einströmende Natrium durch Steigerung ihrer Aktivität aus der Zelle wieder herauszupumpen oder in einem Bereich zu halten, in dem es nicht mehr Calcium verdrängt als die zellulären Calciumspeicher

aufnehmen können, so bleibt die Kontraktionskraft auf der Höhe der Kontrollwerte bestehen. Ist der Natriumeinstrom aber größer, so kommt es zur Kapazitätsüberlastung der Natriumpumpe bei gleichzeitigem Anstieg des intrazellulären Natriums und Calciums und Abnahme des intrazellulären Kaliums, sowie als Folge der toxischen Calciumüberladung zur Abnahme der Kontraktionskraft.

Während die vorübergehende Stimulierung der Na^+/K^+-aktivierbaren Membran-ATPase durch niedrige Konzentrationen herzwirksamer Glykoside immer wieder beobachtet worden ist (Repke, 1963; Lee und Yu, 1963; Klein, 1963; Bonting, 1964; Palmer, 1966; Peters, 1974; Godfraind, 1972, 1973, 1977; Noack, 1979), ist der Einfluß der Schlagfrequenz auf diesen Effekt noch nicht untersucht worden.
Noack et al. (1979) beobachteten bei einer Schlagfrequenz von 90 Schlägen/min stets 3 Minuten nach der Glykosidzugabe (0,1, 0,2 µMol/l Ouabain und 0,6 µMol/l Digitoxigenin) eine vorübergehende, konzentrationsabhängige Stimulierung der Na^+/K^+-Pumpe, die zu einer signifikanten Erhöhung der zellulären Kalium- und Abnahme der Natriumkonzentration führte. Unsere bei einer Schlagfrequenz von 30 und 240 Schlägen/min ausgeführten Untersuchungen ergaben lediglich bei der niedrigen Schlagfrequenz 5 Minuten nach der Zugabe des Glykosides (0,2 uMol/l Ouabain) eine vorübergehende signifikante Natrium- ab- und Kaliumzunahme, die ein indirekter Hinweis für eine Stimulierung der Na^+/K^+-Pumpe ist. Bei 240 Schlägen/min war hingegen kein Effekt des Ouabains auf den zellulären Na^+/K^+-Gehalt zu beobachten.

Wegen der erfolglosen intensiven Bemühungen um den Nachweis dieses Effektes in zahlreichen Versuchsserien kann man davon ausgehen, daß dieser negative Befund nicht auf

methodischen Unzulänglichkeiten beruht. Wir glauben deshalb eher, daß die transitorischen Veränderungen des zellulären Kalium- und Natriumgehaltes als Folge einer Glykosideinwirkung frequenzabhängig sind. Die bisherigen Untersuchungen lassen als Erklärung für den Mechanismus des Effektes den Schluß zu, daß die Na^+/K^+-ATPase mit steigender Frequenz - aufgrund der erhöhten an sie gestellten Anforderungen - stärker stimuliert wird, wobei sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Frequenz ein neues intrazelluläres Elektrolytgleichgewicht mit höherem zellulären Natrium- und Calcium- und erniedrigtem Kaliumgehalt einstellt. Deshalb können herzwirksame Glykoside bei sehr hohen Frequenzen die ATPase nicht noch weiter stimulieren, da bereits eine maximale Aktivität bzw. Pumpleistung erreicht ist. Etwaige Veränderungen im Natrium- und Kaliumgehalt sind dann so gering, daß sie aus methodischen Gründen nicht mehr erfaßbar sind oder überhaupt nicht mehr vorhanden. Als ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme darf auch der Befund gelten, daß es bei Steigerung der Herzfrequenz in Gegenwart herzwirksamer Glykoside frühzeitiger zu einem Wechsel aus der positiven in die negative Inotropie kommt, als dies in Abwesenheit der Glykoside der Fall ist (Bentfeld et al., 1977).

Die Synthese mit $[^{14}C]$ (Geiling, 1950; Okita, 1954) bzw. $[^{3}H]$ (Wartburg, 1965; Wilzbach, 1957) radioaktiv markierter herzwirksamer Glykoside brachte erstmals die Möglichkeit, die Bindung und Aufnahme dieser Substanzen quantitativ zu untersuchen. Nachdem die Na^+/K^+-ATPase als spezifischer Bindungsort für herzwirksame Glykoside als gesichert gelten kann (Repke und Portius, 1963; Besch et al., 1970; Akera et al., 1973; Yoda, 1973), wurde in letzter Zeit häufiger die Frage nach Subtypen von Digitalisrezeptoren mit unterschiedlicher Affinität sowie der Frequenzabhängigkeit der Glykosidbindung dis-

kutiert (Reiter, 1962; Schechter et al., 1970; Baker und Willis, 1972 b; Peters, 1974; Lüllmann, 1975; Godfraind, 1972, 1975; Ghysel-Burton und Godfraind, 1979). Moran (1967) und Kuschinsky (1967) untersuchten als erste den Effekt einer Schlagfrequenzsteigerung auf die Bindung von [^{3}H]-Digoxin an Vorhofgewebe des Meerschweinchens und zeigten, daß ruhende Vorhöfe eine langsamere Aufnahme aufweisen, als solche, die mit 30 und 180 Schlägen/min gereizt werden.
Die Halbwertzeit für die Bindung an ruhende Vorhöfe betrug bei einer Badkonzentration von 0,128 nMol Digoxin/ml 52 Minuten, während sich für schlagende Vorhöfe eine Halbwertzeit von 28 Minuten ergab. Ein signifikanter Unterschied in der [^{3}H]-Digoxinaufnahme zwischen Vorhöfen mit einer Schlagfrequenz von 30 und 180 Schlägen/min bestand dabei nicht. Andere Autoren konnten dagegen bei Untersuchungen am isolierten Papillarmuskel keinen Unterschied in der [^{3}H]-Ouabainbindung ruhender und elektrisch gereizter Papillarmuskeln aufzeigen.

Ebenso uneinheitliche Untersuchungsergebnisse gibt es zur Frage nach verschiedenen Digitalisrezeptorstellen. Während Gardner und Conlon (1972), Gardner und Kiino (1973) und Erdmann und Schoner (1973) in Untersuchungen am menschlichen Erythrozyten und am Herzmuskelgewebe nur einen Digitalisrezeptor beschrieben, konnten Baker und Willis (1972 b) am gleichen Untersuchungsmaterial zwei Glykosidrezeptorstellen nachweisen. Auch Godfraind und Ghysel-Burton (1977) fanden bei Untersuchungen am Vorhofpräparat des Meerschweinchens zwei Glykosidrezeptoren, einen mit hoher und einen mit niedriger Affinität. Neben dieser spezifischen Bindung an den Rezeptor werden Digitalisglykoside auch unspezifisch - in Abhängigkeit von ihrer Lipophilität - an die Herzmuskelzelle gebunden (Godfraind, 1972; Erdmann, 1974). So werden die lipophilen Glykoside Digitoxin und Digoxin wesentlich

stärker unspezifisch gebunden bzw. zellulär aufgenommen als das hydrophile Ouabain (Greenberger et al. 1969). Andere Untersuchungen bestätigen zum Teil die Ergebnisse von Kuschinsky (1967) und Moran(1967).
Die [^{3}H]-Ouabainbindung ruhender Vorhöfe war gegenüber schlagenden signifikant vermindert. Die Halbwertzeit der Ouabainbindung (0,2 µMol/l) bei Vorhöfen mit einer Schlagfrequenz von 90 Schlägen/min betrug 21,7 Minuten. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Kuschinsky (1967) bestand ein signifikanter Unterschied in der Bindung zwischen Vorhöfen mit einer Schlagfrequenz von 30 und 120 sowie 30 und 240 Schlägen/min, nicht jedoch zwischen Vorhöfen mit einer Frequenz von 120 und 240 Schlägen/min. Vergleichbare Ergebnisse erzielten wir bei Untersuchungen mit [^{3}H]-Digoxin. Auch bei diesem Glykosid konnten wir eine signifikante Zunahme der Glykosidbindung zwischen Vorhöfen mit einer Schlagfrequenz von 30 und 240 Schlägen/min nachweisen. Der Unterschied in der Glykosidbindung betraf nur den an den Glykosidrezeptor spezifisch gebundenen Anteil. Die Geschwindigkeit der Rezeptorbesetzung wird demnach zwar von der Schlagfrequenz, nicht jedoch von der Art des Glykosides beeinflusst. Für Ouabain und Digoxin war die jeweilige spezifische Bindung quantitativ vergleichbar. Sie folgte stets - wie zu erwarten - einer Sättigungskinetik.
Das an das Vorhofpräparat unspezifisch gebundene Glykosid wird, wie aus Abb. 12 ersichtlich, unabhängig von der Schlagfrequenz nach einer Reaktion 0. Ordnung aufgenommen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Greenberger et al. (1969) besteht zwischen Ouabain und Digoxin ein erheblicher Unterschied in der Höhe der unspezifischen Aufnahme. Die unspezifische Ouabainaufnahme war mit 0,05 nMol/kg Zellgewicht/ min gegenüber der Digoxinaufnahme mit 3,6 nMol/kg Zellgewicht/min deutlich geringer. Für diesen Unterschied ist wahrscheinlich, wie schon oben erwähnt, die Stärke der Lipophilität der Glykoside verantwortlich.

Bei einer "therapeutischen" Konzentration von 2,5 nMol/l Ouabain und einem Calciumgehalt der Inkubationslösung von 1,82 mMol/l erfolgt die Ouabainbindung bei einer Schlagfrequenz von 90 Schlägen/min in zwei Phasen. Wie aus Abb. 9 zu ersehen ist, zeigt die erste Phase eine schnelle spezifische Bindungskinektik mit einer Halbwertzeit von 2,7 Minuten. Sie ist bereits nach 15 Minuten abgeschlossen. Daran schließt sich eine langsame Bindung mit einer Halbwertzeit von 14,8 Minuten an. Eine Halbierung des extrazellulären Calciumgehaltes auf 0,91 mMol/l führt trotz des Fortbestehens der zweiphasigen Kinetik zu einer insgesamt verlangsamten Bindung. Dabei ist die erste Phase mit einer Halbwertzeit von 5,2 Minuten nach 25 Minuten abgeschlossen. Die Halbwertzeit der langsamen zweiten Phase steigt auf 37,5 Minuten deutlich an (Abb. 10). Andererseits ist beachtenswert, daß nicht nur die spezifische sondern auch die unspezifische Ouabainbindung bei extrazellulärer Calciumreduktion zunimmt. So steigt die unspezifische Ouabainbindung nach Halbierung der extrazellulären Calciumkonzentration von 3,2 pMol Ouabain/kg Zellgewicht/min auf 6,8 pMol Ouabain/kg Zellgewicht/min an. Die spezifische Ouabainbindung nimmt vergleichsweise noch stärker von 3,4 auf 12,6 nMol Ouabain/kg Zellgewicht zu. Wie aus der bekannten Konkurrenz zwischen Glykosiden und Calciumionen um gemeinsame Rezeptorstellen zu erwarten ist, zeigt sich auch in unseren Untersuchungen, daß das Ausmaß der Glykosidbindung mit der extrazellulären Calciumkonzentration eng verknüpft ist.

Über ähnliche Ergebnisse berichten auch Kuschinsky et al. (1967) in Untersuchungen am isolierten Vorhofpräparat, wo bei Reduzierung des extrazellulären Calciums von 1,2 auf 0,36 mMol/l eine verlangsamte Aufnahme von [^{3}H]-Digoxin stattfand. Auch Fricke und Klaus (1975) fanden, daß durch eine Erhöhung des extrazellulären Calciums von 0,45 auf 7,2 mMol/l eine Abnahme der Digoxinaufnahme ausgelöst werden kann. Ebenso berichteten Dutta und Marks

(1969, 1972) über eine Abnahme der myokardialen Ouabain- Digoxin- und Digitoxinaufnahme bei Reduzierung des extrazellulären Calciums von 2,5 bis auf 0 mMol/l.

5. Zusammenfassung

An isolierten, elektrisch gereizten linken Meerschweinchenvorhöfen fanden sich bei systematischer Änderung der Reizfrequenz und Einwirkung herzwirksamer Glykoside folgende Veränderungen des intrazellulären Elektrolytgehaltes, des Extrazellulärraumes und der Kontraktionskraft:

1. Bei stufenweiser Steigerung der Schlagfrequenz von 30 auf 240 Schläge/min waren der intrazelluläre Natrium- und Calciumgehalt signifikant erhöht und der zelluläre Kaliumgehalt signifikant erniedrigt. Gleichzeitig waren der Extrazellulärraum und die Kontraktionskraft signifikant erniedrigt. Bei Verwendung von Krebs-Henseleit- oder Tyrodelösung ergab sich kein qualitativer Unterschied in den beobachteten Veränderungen der zellulären Elektrolytgehalte und der Größe des Extrazellulärraumes.

2. Eine Minute nach einer Frequenzsteigerung von 50 auf 300 Schläge/min stieg die Kontraktionskraft signifikant an, gleichzeitig fiel das intrazelluläre Calcium signifikant ab.

3. Bei einer Herzfrequenz von 30 Schlägen/min fand sich 5 Minuten nach Glykosideinwirkung eine vorübergehende, signifikante Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration bei gleichzeitiger signifikanter Verminderung der zellulären Natriumkonzentration, was als Stimulierung der membrangebundenen Na^+/K^+-Pumpe gedeutet wird. Bei höheren Herzfrequenzen bzw. an ruhenden Vorhöfen konnten keine signifikanten Elektrolytveränderungen nachgewiesen werden.

4. Unter Einwirkung von toxischen Digitoxinkonzentrationen nahm der Extrazellulärraum signifikant ab,

gleichzeitig nahm das intrazelluläre Calcium signifikant zu.

5. An isolierten linken Meerschweinchenvorhöfen wurde die Austauschkinetik von Ouabain mit dem Extrazellulärraum für kurze Inkubationszeiten gemessen. Sofort nach Zugabe des Glykosides waren 28,3 % des Extrazellulärraumes aufgefüllt. Eine vollständige Äquilibrierung (100 %) war nach 20 Minuten erreicht.

6. An linken Meerschweinchenvorhöfen wurde die spezifische Bindung von Ouabain und Digoxin vergleichend untersucht. Gegenüber ruhenden Vorhöfen nahm die Bindung einer 0,3 µmolaren Ouabainlösung innerhalb von 30 Minuten bei einer Frequenz von 30, 120 und 240 Schlägen/min signifikant zu. Der Effekt war also frequenzabhängig. Auch die Bindung von Digoxin (Endkonzentration 0,6 µMol/l) war bei 30, 60 und 240 Schlägen/min frequenzabhängig.
In Gegenwart einer 0,2 µmolaren Ouabainlösung erreichte die spezifische Bindung bei einer Schlagfrequenz von 90 Schlägen/min nach 90 Minuten ein Steady-state (453 nMol/kg Zellgewicht). Die Halbwertzeit dieses Vorganges betrug 21,7 Minuten.
Die unspezifische Bindung zeigte für Ouabain und Digoxin ein lineares Verhalten. Sie war für beide Glykoside frequenzabhängig und betrug für Ouabain 0,046 nMol/kg Zellgewicht/min und für Digoxin 3,6 nMol/kg Zellgewicht/min.
In Gegenwart von 2,5 nMol/l Ouabain wurde eine schnelle und eine langsame Rezeptorbesetzung mit Halbwertzeiten von 2,7 und 14,8 Minuten ermittelt. Nach Halbierung des Calciumgehaltes der Inkubationslösung auf 0,91 mMol/l Calcium waren die entsprechenden Halbwertzeiten auf 5,2 bzw. 37,5 Minuten verlängert. Dabei nahm die spezifische und unspezifische Ouabainbindung zu.

6. Dank an den Referenten

Herrn Professor Dr. med. E. Noack danken wir für die freundliche Überlassung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die zur Durchführung der Arbeit erforderlichen Mittel, besonders aber für seine über zwei Jahre währende Betreuung und seine zahlreichen wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Ausführung unserer Versuche!

Fräulein Stöcker und Herrn Steinbach gilt unser Dank für ihre freundliche und tatkräftige Unterstützung unserer experimentellen Arbeit.

7. Literaturverzeichnis

AKERA, T., LARSON, F.S. and BRODY, T.M.:
Correlation of cardiac sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase activity with ouabain-induced inotropic stimulation.
J. Pharm. Exp. Therap. 173, 145-151, 1970

AKERA, T., BASKIN, S.I., TOBIN, T., BRODY, T.M.:
Temporal Relationship between the Inotropic Effect and the in vitro Binding to, and Dissociation from $(Na^+ + K^+)$-Activated ATPase.
Naunyn-Schmiedeberg's Ach. Pharmacol. 277, 151-162, 1973

AKERA, T., BRODY, T.M., WIEST, S.A.:
Saturable adenosine 5'-triphosphate-independent binding of [^{3}H]-Ouabain to brain and cardiac tissue in vitro.
J. Pharmac. 65, 403-409 1979

BAKER, P.F. and WILLIS, J.S.:
Inhibition of the sodium pump in squid giant axons by cardiac glycosides: dependence on extracellular ions and metabolism
J. Physiol. 224, 463-475, 1972 a

BAKER, P.F., WILLIS, J.S.:
Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells
J. Physiol. 224, 441-462, 1972 b

BAUER, H.:
Über die Bestimmung und die Größe des Extrazellulärraumes von Meerschweinchenvorhöfen.
Thesis, Mainz 1961

BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, Th. und PROPPE, D.:
Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle.
Br. J. Pharmacol. 61, 19-27, 1977

BESCH, H.R., ALLEN, J.C., GLICK, G., SCHWARZ, A.:
Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium.
J. Pharmacol. exp. Ther. 171, 1-12, 1970

BLOOD, B.E.:
The influence of low doses of ouabain and potassium ions on sheep Purkinje fibre contractility.
J. Physiol. 251, 69-70, 1975

BODEM, G., DENGLER, H.J., COLTART, J.:
Cardiac glycosides, significance of plasma concentration of digoxin in relation to the myocardial concentration of the trug.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Part 1 135-159, 1978

BODEM, G., DENGLER, H.J., KUHLMANN, J., RIETBROCK, N., SCHNIEDERS, B.,:
Cardiac glycosides, Tissue distribution of Cardiac glycosides.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Part 1, 109 - 126, 1978

BONTING, S.L., HAWKINS, N.M., CANADY, M.R.:
Studies of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase.
Biochemical Pharmacol. 13, 13 - 22, 1964

BOWDITCH, H.:
Über die Eigenthumlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen.
Berichte über die Verhandlungen der königlichen sächsischen Gesellschaft (Akad.) der Wissenschaften zu Leipzig 23, 625, 1871

CARSLAKE, M.C, WEATHERALL, M.:
Changes in sodium, potassium and chloride of rabbit auricles treated with ouabain.
J. Physiol. London 163, 347 - 361, 1962

COHEN, I., DAUT, J., NOBLE, D.:
An analysis of the actions of low concentration of ouabain on membrane currents in Purkinje fibres.
J. Physiol. 260, 75 - 103, 1976

CONN, H.L.jr., ROBERTSON, J.S.:
Kinetics of potassium transfer in the left ventricle of the intact dog.
Am. J. Physiol. 181, 319, 1955

DE POVER, A., GODFRAIND, T.:
Parameters of [^{3}H]-Ouabain binding to human heart Na^+/K^+-ATPase.
Bioch. Pharmacol, im Druck, 1980

DUTTA, S., GOSWAMI, S., DATTA, D.F., LINDOWER, J.O., MARKS, B.H.:
The uptake and binding of six radiolabeled cardiac glycosides by guinea-pig hearts and by isolated sarcoplasmic reticulum.
J. Pharm. Exp. Therap. 164, 10 - 21, 1968

DUTTA, S., MARKS, H.:
Factors that regulate Ouabain-H^3 accumulation by the isolated guinea-pig heart.
J. Pharmac. exp. Therap. 170, 318 - 325, 1969

DUTTA, S., MARKS, B.H.:
Species and ionic influences on the accumulation of digitalis glycosides by isolated perfused hearts.
Br. J. Pharmacol 46, 401 - 408, 1972

EGLI, K.:
Der Einfluß der extrazellulären Kalium- und Kalzimkonzentration auf den Elektrolythaushalt, die Kontraktionskraft und den Extrazellulärraum isolierter Meerschweinchenvorhöfe.
Dissertation, Düsseldorf, 1975

ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of Kinetic constants and Dissociation constants.
Bioch. et Bioph. Acta 307, 386 - 398, 1973

ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$-ATPase preparations: The molecular strukture of different cardioactive steroid and other substances and their affinity to the glycoside receptor.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Ph. 283, 335 - 356, 1974

ERDMANN, E., HASSE, W.:
Qualitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes.
J. Physiol. 251, 671 - 682, 1975

FELGENTRÄGER, J., ZETTNER, B.:
Beeinflussung des myokardialen Elektrolystoffwechsels durch positiv inotrope Konzentrationen herzwirksamer Glykoside.
Dissertation, Düsseldorf, 1979

FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut,
183 - 206, 1977

FRICKE, U., GERBER, H.-G.:
Vergleich der subcellulären Beurteilung von H^3-Strophantin und H^3-Digitoxin im Meerschweinchenherzen.
Archiv Exp. Pathol. Pharm. 263, 266 - 267, 1969

FRICKE, U., KLAUS, W.:
Dependence of the cardiac uptake of digitalis glycosides on the extracellular calcium concentration in guinea-pig isolated hearts.
Eur. J. Pharmacol. 30, 182 - 187, 1975

FRICKE, U., KLAUS, W.:
Evidence for two different Na^+ dependent [^{3}H]-Ouabain binding sites of a Na^+-K^+-ATPase of guinea-pig hearts.
Br. J. Pharm. 61, 423 - 428, 1977

GARDNER, J.D., CONLON, T.P.:
The effects of sodium and potassium on ouabain binding by human erythrocytes.
J. gen. Physiol. 60, 609 - 629, 1972

GARDNER, J.D., KIINO, D.R.:
Ouabain binding and cation transport in human erythrocytes.
J. clin. Invest. 52, 1845 - 1851, 1973

GEILING, E.M.K., KELSEY, F.E., GANZ, A., WALASZEK, E.J., OKITA, G.T., FISHMAN, S., SMITH, L.B.:
Biosynthesis of radioactive medicinally important drugs with special reference to digitoxin.
Trans. Ass. amer. Physicians 63, 191, 1950

GERVAIS, A., LANE, L.K., AMER, B.M., LINDENMAYER, G.E., SCHWARTZ, A.:
A possible molecular mechanism of the action of digitalis.
Circ. Res. 40, 8 - 19, 1977

GEYER, R.P., BOWIE, E.J.:
The direct microdetermination of tissue calcium by flame photometrie.
Anal. Biochem. 2, 360 - 369, 1961

GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.:
Stimulation and inhibition by ouabain of the sodium pump in guinea-pig atria.
Brit. J. Pharmacol. 55, 249, 1975

GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.:
Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardio-active steroids in relation to their binding sites and their inotropic effect on guinea-pig isolated atria.
Brit. J. Pharm. 66, 175 - 184, 1979

GLITSCH, H.G., REUTER, H., SCHOLZ, H.:
The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles.
J. Physiol. (Lond.) 209, 25 - 43, 1970

GODFRAIND, T., LESNE, M.:
The uptake of cardiac glycosides in relation to their actions in isolated cardiac muscle.
Br. J. Pharm. 46, 488 - 497, 1972

GODFRAIND, T.:
Cardiac glycosides receptors in the heart.
Biochem. Pharmacol. 24, 823 - 827, 1975

GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.:
Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump.
Nature 265, 165 - 166, 1977

GREEFF, K., MENG, K., MOOG, E.:
Der Einfluß nichttoxischer und toxischer Konzentrationen herzwirksamer Glykoside auf die Kaliumbilanz isolierter Herzpräparate.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharm. 244, 270 - 282, 1962

GREENBERGER, N.J., MAC DERMOTT, R.P., MARTIN, J.F., DUTTA, S.:
Intestinal absorption of six tritium-labeled digitalis glycosides in rats and guinea-pig.
J. Pharm. Exp. Therap. 167, 265 - 273, 1969

HAFNER, D., HEINEN, E., NOACK, E.:
Mathematical analysis of concentration-response relationships.
Drug Research 27 (II), 1871 - 1873, 1977

HAJDU, S.:
Mechanism of staircase and contracture in ventricular muscle.
Am. J. Physiol. 174, 371, 1953

HANSEN, O.:
The relationship between g-strophantin-binding capacity and ATPase activity in plasmamembrane fragments from ox brain.
Biochem. Biophys. Acta 233, 122 - 132, 1971

HAUSTEIN, K.O., HAUPTMANN, J.:
Studies on cardioactive steroids: II. Structure-activity relationship in the isolated guinea-pig heart.
Pharmacol. 11, 129 - 138, 1974

HEINEN, E., NOACK, E.:
Effects of k-strophanthidin and digitoxigenin on contractile force, calcium content and exchange in guinea-pig isolated atria.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 275, 359 - 371, 1972

HODITZ, H., LÜLLMANN, H.:
Die Calciumumsatzgeschwindigkeit ruhender und kontrahierender Vorhofmuskulatur in vitro.
Pflügers Archiv 280, 22 - 29, 1964

HUMPHREY, E.W., JOHNSON, J.A.:
Potassium flux in the isolated perfused heart.
Am. J. Physiol. 198, 1211, 1960

KLAUS, W., KREBS, R.:
Kinetische Analyse der Calciumkompartimente im Meerschweinchenherzen unter Kontrollbedingungen und Strophanthineinwirkung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 277 - 292, 1974

KLEIN, R.L.:
The induction of a transfer adenosine triphosphohydrolase in embryonic chick heart.
Biochim. Biophys. Acta 73, 488 - 498, 1963

KUSCHINSKY, K., LAHRTZ, H., LÜLLMANN, H., VAN ZWIETEN, P.A.:
Accumulation and release of ^{3}H digoxin by guinea-pig heart muscle.
Brit. J. Pharmacol. 30, 317 - 328, 1967 a

KUSCHINSKY, K., LÜLLMANN, H., SCHMITZ, G.:
Zur Frage der Bindung von H^{3}-Digoxin an Herzmuskelgewebe.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path. 258, 297 - 308, 1967 b

KUSCHINSKY, K., LÜLLMANN, H., VAN ZWIETEN, P.A.:
A comparison of the accumulation and release of H^{3}-Ouabain and H^{3}-Digitoxin by guinea-pig heart muscle.
Br. J. Pharmac. Chemother. 32, 598 - 608, 1968

KUSCHINSKY, K., LÜLLMANN, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
Thieme, Stuttgart, 93 - 109, 1976

LANGER, G.A.:
Calcium exchange in dog ventricular muscle: relation to frequency of contraction and maintenance of contractility.
Circulat. Research 17, 78 - 89, 1965

LANGER, G.A., BRADY, A.J.:
Potassium in dog ventricular muscle: kinetic studies of distribution and effects of varying frequency of contraction and potassium concentration of perfusate.
Circul. Research 18, 164 - 177, 1966

LANGER, G.A.:
Sodium exchange in dog ventricular muscle.
J. Gen. Physiology 50, 1221 - 1239, 1967

LANGER, G.A.:
Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.
Physiol. Rev. 48, 708 - 757, 1968

LEE, K.S., YU, D.H.:
A study of the sodium- and potassium-activated ATPase activity of heart microsomal fraction.
Biochemical Pharmacology 12, 1253 - 1264, 1963

LEE, K.S., KLAUS, W.:
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of CG.
Pharmacol. Rev. 23, 193 - 261, 1971

LEGATO, M.J., SPIRO, D., LANGER, G.A.:
Ultrastructural alterations produced in mammalian myocardium by variation in perfusate ionic composition.
J. Cell. Biol. 37, 1 - 12, 1968

LINDEN, J., BROOKER, G.:
Sodium requirement for effects of Ouabain on contraction of isolated guinea-pig atria.
Circ. Res. 46 (4), 553 - 564, 1980

LÜLLMANN, H., HOLLAND, W.C.:
Influence of ouabain on an exchangeable calcium fraction, contractile force and resting tension of guinea-pig atria.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 137, 186 - 192, 1962

LÜLLMANN, H., PETERS, T., RAVENS, U.:
Studies on the kinetics of [^{3}H]-Ouabain uptake and exchange in the isolated papillary muscle of the guinea-pig.
Br. J. Pharmac. 53, 99 - 107, 1975

LÜLLMANN, H., PETERS, T.:
Cardiac effects of cardiac glycosides: Influence on cell membrane.
im Druck, 1980

MC CLANE, T.:
A biphasic action of ouabain on sodium transport in the toad bladder.
J. Pharmac. exp. Ther. 148, 106 - 110, 1965

MORAN, N.C.:
Contraction dependency of the positive inotropic action of cardiac glycosides.
Circ. Res. 21, 727 - 740, 1967

MORGENSTERN, M., NOACK, E., KÖHLER, E.:
The effects of isoprenaline and tyramine on the ^{45}Ca uptake, the total calcium content and the contraction force of isolated guinea-pig atria in dependence on different extracellular hydrogen ion concentrations.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 125 - 137, 1972

NAYLER, W.G., NOACK, E.:
Influence of cardiac glycosides on electrolyte exchange of cardiac cell muscle.
Hefter-Heubners Handbuch der Pharmakologie, K. Greeff Hrsg., Springer Verlag Heidelberg, im Druck, 1980

NOACK, E.:
Factors influencing the size of inulin space in isolated atria.
J. Mol. cell. Cardiol. 11, Suppl.2, 42, 1979

NOACK, E., GREEFF, K.:
Ca^{2+} uptake and storage in isolated heart mitochondria influenced by Na^{+} and K^{+}.
Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, vol. 5,: Basis functions of Cations in Myocardial Activity. University Park Press, Baltimore, 1975

NOACK, E., HEINEN, E.:
Relationship between cellular electrolytes and the contraction force of isolated guinea-pig atria with special regard to the extracellular space volume.
Life Sciences 22 (8), 685 - 694, 1978

NOACK, E., FELGENTRÄGER, J., ZETTNER, B.:
Kinetics of changes in K^{+}, Na^{+} and Ca^{2+} content in heart tissue in the presence of cardiac glycosides.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, R 34, 1978

NOACK, E., FELGENTRÄGER, J., ZETTNER, B.:
Changes of the myocardial Na and K content during the development of cardiac glycosides inotropy.
J. of Mol. and Cell. cardiol. 11, 1189 - 1194, 1979

OKITA, G.T., RICHARDSON, F., ROTH-SCHECHTER, B.F.:
Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 185, 1 ff, 1973

PALMER, R.F., LASSETER, K.C., MELVIN, S.L.:
Stimulation of Na^{+}- and K^{+}-dependent adenosine triphosphatase by ouabain.
Arch. Biochim. Biophys. 113, 629 - 633, 1966

PETERS, T., RABEN, R.H., WASSERMANN, O.:
Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the Na^{+}-K^{+}-ATPase by ouabain, cassaine and their alkylating derivatives.
Eur. J. Pharmacol. 26, 166 - 174, 1974

PORTIUS, H.J., REPKE, K.R.H.:
Das Na^++K^+-aktivierte, Mg^{++}-abhängige Adenosintriphosphat Phosphohydrolase-System des Herzmuskels - Darstellung, Eigenschaften und Funktion sowie Charakterisierung als Digitalisrezeptor.
Berlin, Humboldt-Universität, Biolog. Fak., Hab. Schrift vom 26.2.1970

PRINDLE, K.H., SKELTON, C.L., EPSTEIN, S.E. et al.:
Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropic effect of tritiated digoxin.
Circ. Res. 28, 337 - 345, 1971

RAYNER, B., WEATHERALL, M.:
Acetylcholine and potassium movements in rabbit auricles.
J. Physiol. 164, 392 - 409, 1959

REPKE, K.:
First International Pharmacological Meeting
Pergamon Press New York, Vol. 3, 47, 1963

REPKE, K., PORTIUS, H.J.:
Über die Identität der Ionenpumpen ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym.
Experientia (Basel), 19, 452 - 459, 1963

REUTER, H.:
Exchange of calcium ions in mammalian myocardium. Mechanism and physiological significance.
Circ. Res. 34, 599 - 605, 1974

ROTH-SCHECHTER, B.F., OKITA, G.T., ANDERSON, D., RICHARDson, F.F.:
Relationship among contraction, drugbinding and positive iontropic action of Digoxin.
J. Pharm. Exp. Therap. 171, 249 - 255, 1970

SARNOFF, S.J., GILMORE, J.P., MITCHEL, J.H., REMENSNYDER, J.P.:
Potassium changes in the heart during homeometric autoregulation and acetyl strophanthidin.
Am. J. of Medicine 34, 440 - 451, 1963

SCHÖNFELD, W., SCHÖN, R., MINKE, K.H., REPKE, K.R.H.:
Identification of conformational states of transport ATPase by cinetic analysis of ouabain binding.
Acta biol. med. germ. 29, 643 - 659, 1972

SCHONER, W.:
Zum aktiven Na^+-K^+-Transport durch die Membran tierischer Zellen.
Angew. Chem. 23, 947 - 990, 1971

SCHWARTZ, A., MATSUI, H., LAUGHTER, A.H.:
Tritiated digoxin binding to Na^+-K^+-activated adenosine triphosphatase: Possible allosteric site.
Science 159, 323 - 325, 1968

SCHWARTZ, A., ALLEN, J.C., HARIGAYA, S.:
Possible involvment of cardiac Na^+-K^+-ATPase in the mechanism of action of cardiac glycosides.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 168, 31 - 41, 1969

TUTTLE, R.S., FARAH, A.:
The effect of ouabain on the frequency-force relationship and on pot-stimulation potentiation in isolated atrial and ventricular muscle.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 135, 142 - 150, 1962

TUTTLE, R.S., WITT, P.N., FARAH, A.:
The influence of ouabain on intracellular Na and K concentrations in the rabbit myocardium.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 133, 281 - 287, 1961

TUTTLE, R.S., WITT, P.N., FARAH, A.:
Therapeutic and toxic effects of ouabain on K^+ fluxes in rabbit atria.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 137, 24 - 30, 1962

WARTBURG, A.T., KALBER, T., RUTSCHMANN, J.:
Tritium labeled cardiac glycosides: Digoxin (12 a - ^3H).
Biochem. Pharmacol. 4, 1883, 1965

WHITSETT, J.A., WALLICK, E.T.:
^3H Ouabain binding and Na^+-K^+-ATPase activity in human placenta.
Am. J. Physiol. 238 (1) E 38 - 45, 1980

WILZBACH, K.E.:
Tritium labeling by exposure of organic compounds to tritiumgas.
J. Amer. chem. Soc. 79, 1013, 1957

WINEGRAD, S., SHANES, A.M.:
Calcium flux and contractility in guinea-pig atria.
J. Gen. Physiol. 45, 371 - 394, 1962

YODA, A.:
Structure-activity relationship of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium- and potassium-dependent ATPase.
Molecular Pharmacology 9, 51 - 60, 1973

8. Lebensläufe

v o n B e r g h , Mischa

geb. 12. März 1950 in Ulm,
1956 - 1961 Volksschule Ulm,
1961 - 1970 Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium Montabaur,
1970 Allgemeine Hochschulreife,
1970 - 1972 Ausbildung zum Apothekerassistenten,
1972 - 1973 Ausbildung zum Technischen Zeichner im Betrieb des Vaters,
1973 - 1974 Wehrdienst als Sanitäter,
1975 - 1981 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf,
verheiratet seit 1974, ein Sohn.

Z a g r o d n i c k , Joachim

geb. 30. September 1953 in Beuthen/Polen,
1960 - 1968 Volksschule Beuthen,
1968 Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland,
1968 - 1974 Städtisches Aufbaugymnasium Moers,
1974 Allgemeine Hochschulreife,
1974 - 1975 Studium der Chemie an der Universität Düsseldorf,
1975 - 1981 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf.